

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01801629.4

*C12N 15/13 (2006.01)*  
*C07K 16/24 (2006.01)*  
*C07K 16/46 (2006.01)*  
*A61K 47/48 (2006.01)*  
*C07K 19/00 (2006.01)*  
*C12N 15/62 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1289671C

[51] Int. Cl. (续)

*C12N 15/70 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 19/02 (2006.01)*

*A61P 37/06 (2006.01)*

[22] 申请日 2001.6.5 [21] 申请号 01801629.4

[30] 优先权

[32] 2000.6.6 [33] GB [31] 0013810.7

[86] 国际申请 PCT/GB2001/002477 2001.6.5

[87] 国际公布 WO2001/094585 英 2001.12.13

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.6

[73] 专利权人 细胞技术研究及开发有限公司

地址 英国伯克郡

[72] 发明人 D·S·阿斯瓦尔 D·T·布劳恩

A·N·C·维尔

A·G·波普莱维尔

A·P·查普曼 D·J·金

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

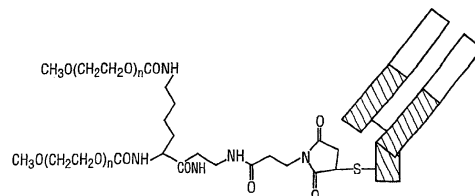
权利要求书 5 页 说明书 83 页 附图 27 页

[54] 发明名称

对人肿瘤坏死因子  $\alpha$  具有特异性的抗体分子及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种抗体分子，其包含至少一种来源于小鼠单克隆抗体的，对  $\text{TNF}\alpha$  具有特异性的 CDR。本发明还公开了一种移植了 CDR 的抗体，其中至少一种 CDR 是杂种 CDR。本发明进一步公开了编码抗体分子链的 DNA 序列，载体，转化的宿主细胞，及抗体分子在治疗  $\text{TNF}\alpha$  介导的疾病中的用途。



1. 一种对人 TNF $\alpha$  具有特异性的抗体分子，其包含一个重链，其中的可变域包含一 CDR，该 CDR 包含至少一个 CDRH1 的 SEQ ID NO: 1，CDRH2 的 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 7，或 CDRH3 的 SEQ ID NO: 3；和一个轻链，其中的可变域包含一 CDR，该 CDR 包含至少一个 CDRL1 的 SEQ ID NO: 4，CDRL2 的 SEQ ID NO: 5，或 CDRL3 的 SEQ ID NO: 6。

2. 如权利要求 1 的抗体分子，其包含 CDRH1 的 SEQ ID NO: 1，CDRH2 的 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 7，CDRH3 的 SEQ ID NO: 3，CDRL1 的 SEQ ID NO: 4，CDRL2 的 SEQ ID NO: 5，和 CDRL3 的 SEQ ID NO: 6。

3. 如权利要求 2 的抗体分子，其包含 CDRH2 的 SEQ ID NO: 2。

4. 如权利要求 1 的抗体分子，其中重链可变域的人受体构架区是以人类 1 组共有序列为基础的，且包含 28，69 和 71 位的非-人供体残基。

5. 如权利要求 1 的抗体分子，其中重链可变域的人受体构架区是以人类 1 组共有序列为基础的，且包含 28，38，46，67，69 和 71 位的非-人供体残基。

6. 如权利要求 1 的抗体分子，其中重链可变域的人受体构架区是以人类 3 组共有序列为基础的，且包含 27，28，30，48，49，69，71，73，76 和 78 位的非-人供体残基。

7. 如权利要求 1 的抗体分子，其中轻链可变域的人受体构架区是以人类 1 组共有序列为基础的，且包含 46 和 60 位的非-人供体残基。

8. 如权利要求 1 的抗体分子，其包含如 SEQ ID NO: 8 所示的轻链可变域 hTNF40-gL1 和如 SEQ ID NO: 11 所示的重链可变域 gh3hTNF40. 4。

9. 如权利要求 1 的抗体分子，其是一种 Fab 片段。

10. 如权利要求 9 的抗体分子，其是一种 Fab 片段，其中包含一个具有 SEQ ID NO: 111 所列序列的重链和一个具有 SEQ ID NO: 113 所列序列的轻链。

11. 如权利要求 1 的抗体分子，其是一种修饰的 Fab 片段，该片段重链的 C-端具有一个或多个氨基酸，允许与效应分子或报道分子相连接。

12. 如权利要求 11 的抗体分子，其中附加的氨基酸形成含一个或

两个半胱氨酸残基的修饰铰合区，效应分子或报道分子可与之相连接。

13. 如权利要求 8 的抗体分子，其是一种修饰的 Fab 片段，该片段含一个具有 SEQ ID NO: 115 所列序列的重链，和一个具有 SEQ ID NO: 113 所列序列的轻链。

14. 如权利要求 1 的抗体，其是鼠抗-TNF $\alpha$ 的单克隆抗体 hTNF40。

15. 如权利要求 1 的抗体分子，其是一种嵌合抗体分子，其中含权利要求 14 的单克隆抗体的轻链可变域和重链可变域。

16. 权利要求 1 的抗体分子，所示抗体分子包含杂种 CDR，该杂种 CDR 包含被平截了 1-8 个氨基酸的供体 CDR 序列，其中 CDR 序列的缺失部分来源于具有共有序列构架区的种系抗体，供体 CDR 的缺失部分可用不同的序列代替，并形成一功能性的 CDR，且重链的 CDRH2 是在抗体分子中杂交的。

17. 如权利要求 16 的抗体分子，其中平截 4-6 个氨基酸。

18. 如权利要求 16 的抗体分子，其中在 CDR 的 C-端进行平截。

19. 如权利要求 1 的抗体分子，其中轻链包含 SEQ ID NO: 113 所列序列。

20. 如权利要求 1 的抗体分子，其中轻链由 SEQ ID NO: 113 所列序列组成。

21. 如权利要求 1 的抗体分子，其中重链包含 SEQ ID NO: 115 所列序列。

22. 如权利要求 1 的抗体分子，其中重链由 SEQ ID NO: 115 所列序列组成。

23. 一种对人 TNF $\alpha$ 具有特异性的抗体分子，其具有一个含 SEQ ID NO: 113 所列序列的轻链，和一个含 SEQ ID NO: 115 所列序列的重链。

24. 一种对人 TNF $\alpha$ 具有特异性的抗体分子，其具有一个由 SEQ ID NO: 113 所列序列组成的轻链，和一个由 SEQ ID NO: 115 所列序列组成的重链。

25. 一种含权利要求 11-13 和 19-24 中任意一项抗体分子的化合物，具有共价连接到抗体分子重链 C-端的一个氨基酸上或抗体分子重链 C-端的效应分子或报道分子。

26. 如权利要求 25 的化合物，其包含一种效应分子。

27. 如权利要求 26 的化合物, 其中的效应分子包含一种或多种聚合物。

28. 如权利要求 27 的化合物, 其中的一种或多种聚合物是任选取代的直链或支链聚亚烷基, 聚亚烯基或聚亚氧烷基的聚合物, 或支链或无支链的多糖。

29. 如权利要求 28 的化合物, 其中的一种或多种聚合物是甲氧基聚乙二醇。

30. 一种含权利要求 13 的抗体分子的化合物, 其中位于抗体分子重链 C-端的其中一个半胱氨酸残基与赖氨酰-马来酰亚胺基相连接, 其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇上。

31. 一种含对人 TNF  $\alpha$  具有特异性的抗体分子的化合物, 其具有一个含 SEQ ID NO: 113 所列序列的轻链, 和一个含 SEQ ID NO: 115 所列序列的重链, 位于抗体分子重链 C-端的其中一个半胱氨酸残基与一种或多种合成或天然存在的聚合物相连接。

32. 一种含对人 TNF  $\alpha$  具有特异性的抗体分子的化合物, 其具有一个由 SEQ ID NO: 113 所列序列组成的轻链, 和一个由 SEQ ID NO: 115 所列序列组成的重链, 位于抗体分子重链 C-端的其中一个半胱氨酸残基与一种或多种合成或天然存在的聚合物相连接。

33. 一种含权利要求 19 的抗体分子的化合物, 其具有与位于重链 C-端的一个半胱氨酸残基相连接的赖氨酰-马来酰亚胺基, 其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

34. 一种含权利要求 20 的抗体分子的化合物, 其具有与位于重链 C-端的一个半胱氨酸残基相连接的赖氨酰-马来酰亚胺基, 其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

35. 一种含权利要求 21 的抗体分子的化合物, 其具有与位于重链 C-端的一个半胱氨酸残基相连接的赖氨酰-马来酰亚胺基, 其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

36. 一种含权利要求 22 的抗体分子的化合物, 其具有与位于重链

C-端的一个半胱氨酸残基相连接的赖氨酰-马来酰亚胺基，其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

37. 一种含对人 TNF $\alpha$  具有特异性的抗体分子的化合物，其具有一个含 SEQ ID NO: 113 所列序列的轻链和一个含 SEQ ID NO: 115 所列序列的重链，位于抗体分子重链 C-端的其中一个半胱氨酸残基与赖氨酰-马来酰亚胺基相连接，其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

38. 一种含对人 TNF $\alpha$  具有特异性的抗体分子的化合物，其具有一个由 SEQ ID NO: 113 所列序列组成的轻链和一个由 SEQ ID NO: 115 所列序列组成的重链，位于抗体分子重链 C-端的其中一个半胱氨酸残基与赖氨酰-马来酰亚胺基相连接，其中各个赖氨酰残基的氨基共价连接到具有约 20,000Da 分子量的甲氧基聚乙二醇残基上。

39. 一种编码权利要求 1、16 或 24 中任意一项的抗体分子的重链和轻链的 DNA 序列。

40. 如权利要求 39 的 DNA 序列，其包含 SEQ ID NO: 8 或 112 所列的序列与 SEQ ID NO: 10、11、110 或 114 所列的序列。

41. 一种含权利要求 39 的 DNA 序列的克隆或表达载体。

42. 一种含权利要求 39-40 中任意一项 DNA 序列的大肠杆菌表达载体。

43. 如权利要求 42 的大肠杆菌表达载体，其是插入了 CDP870 基因的载体 pTT0。

44. 一种用权利要求 41-43 任意一项载体转化的宿主细胞。

45. 一种生产权利要求 1、16 或 24 中任意一项抗体分子的方法，包含培养权利要求 44 的宿主细胞，并分离该抗体分子。

46. 一种生产权利要求 1、16 或 24 中任意一项抗体分子的方法，包括培养含大肠杆菌表达载体的大肠杆菌，其中该大肠杆菌表达载体含权利要求 41 的 DNA 序列，并分离该抗体分子。

47. 如权利要求 46 的方法，其中该抗体分子被导向胞质。

48. 一种治疗或诊断组合物，其包含权利要求 1、16 或 24 中任意一项的抗体分子或权利要求 25 的化合物。

49. 对人 TNF $\alpha$  具有特异性的，权利要求 1、16 或 24 中任意一项的

抗体分子，或权利要求 25 的化合物在制备治疗 TNF $\alpha$ 介导的病状的药物中的用途。

50. 如权利要求 49 的用途，其中的病状是类风湿性关节炎或骨关节炎。

51. 载体 pDNAEng-G1。

52. 插入了 CDP870 基因的载体 pTTO。

53. 一种多肽，所述多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 1-7 中任意一个所列氨基酸序列。

## 对人肿瘤坏死因子 $\alpha$ 具有特异性的抗体分子及其用途

本发明涉及一种对人肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 的抗原决定簇具有特异性的抗体分子。本发明还涉及该抗体分子的治疗用途, 及生产该抗体分子的方法。

本发明涉及抗体分子。在抗体分子中, 有两个重链和两个轻链。各重链和各轻链的 N-端均有一个可变域。各个可变域是由四个构架区 (FRs) 组成的, 该构架区与三个互补性决定区 (CDRs) 相交替。可变域中的残基通常是根据 Kabat 等人设计的系统编号的。此系统是在 Kabat 等, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (此后称为“Kabat 等 (supra)”) 中提出的。除非另有说明, 否则将该编号系统用于本发明的说明书中。

Kabat 残基的命名并非总是与线性氨基酸残基的编号直接相关。与严格的 Kabat 编号方式相比, 相应于缩短, 或插入基本可变域结构的结构性组分, 构架或 CDR, 实际的线性氨基酸序列可包括较少的或附加的氨基酸。通过与具有“标准” Kabat 编号序列抗体中的同系物的残基进行序列对比, 可确定所提供抗体残基正确的 Kabat 编号。

根据 Kabat 编号方式, 重链可变域的 CDRs 位于第 31-35 位 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) 位和 95-102 位 (CDRH3) 的残基上。

根据 Kabat 编号方式, 轻链可变域的 CDRs 位于第 24-34 位 (CDRL1), 50-56 位 (CDRL2) 和 89-97 位 (CDRL3) 残基上。

欧洲专利申请 EP-A-0239400 中描述了移植了 CDR 的抗体的结构, 该文献还公开了一种方法, 其中使用长链的寡核苷酸, 通过定点诱变, 把小鼠单克隆抗体的 CDR 移植到人免疫球蛋白可变域的构架区上。该 CDR 可确定抗体的抗原结合特异性, 且其是携带在可变域构架区上相对较短的肽序列。

有关通过移植 CDR 而使单克隆抗体人源化的早期研究工作是在识别合成抗原, 如 NP 的单克隆抗体上进行的。Verhoeyen 等 (Science, 239, 1534-1536, 1988) 和 Riechmann 等 (Nature, 332, 323-324,

1988) 分别描述了通过 CDR 移植, 使识别溶菌酶的小鼠单克隆抗体和识别人 T-细胞上抗原的大鼠单克隆抗体人源化的实施例。

Riechmann 等发现单独转移 CDR (如 Kabat (Kabat 等 (supra) 和 Wu 等, *J. Exp. Med.*, 132, 211-250, 1970) 所定义的) 不足以在移植了 CDR 的产物中提供令人满意的抗原结合活性。人们发现, 不得不改变许多构架残基, 以使它们与供体构架区的那些相对应。国际专利申请 W090/07861 中描述了选择需改变的构架残基的草拟标准。

目前已公开了很多讨论移植了 CDR 的 (CDR-grafted) 抗体的评论, 包括 Vaughan 等 (*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998)。

TNF $\alpha$  是一种促炎细胞因子, 它通过免疫系统的细胞释放并与之相互作用。因而, TNF $\alpha$  是通过巨噬细胞释放的, 其中的巨噬细胞已经被革兰氏阴性菌的脂多糖 (LPS) 活化。本身, TNF $\alpha$  是一种重要的内源介质, 其涉及与细菌性脓毒症有关的内毒素性休克的发病和发展。TNF $\alpha$  还可以正向调节许多人类疾病, 包括慢性疾病, 如类风湿性关节炎, 克罗恩氏病, 溃疡性结膜炎和多发性硬化症。人 TNF $\alpha$  的转基因鼠可产生组成型高水平的 TNF $\alpha$ , 并发展成一种自发的, 有害的, 类似类风湿性关节炎的多发型关节炎 (Kaffer 等, *EMBO J.*, 10, 4025-4031, 1991)。因此将 TNF $\alpha$  称为促炎细胞因子。

在现有技术中已经描述了 TNF $\alpha$  的单克隆抗体。Meager 等, (*Hybridoma*, 6, 305-311, 1987) 描述了鼠科动物重组 TNF $\alpha$  的单克隆抗体。Fendly 等, (*Hybridoma*, 6, 359-370, 1987) 描述了鼠科动物重组 TNF $\alpha$  的单克隆抗体在定义 TNF 上的中和表位中的用途。Shimamoto 等 (*Immunology Letters*, 17, 311-318, 1988) 描述了鼠科动物 TNF $\gamma$  的单克隆抗体, 及其在预防鼠类动物内毒素性休克中的用途。此外, 国际专利申请 W092/11383 公开了对 TNF $\alpha$  具有特异性的重组抗体, 包括移植了 CDR 的抗体。Rankin 等 (*British J. Rheumatology*, 34, 334-342, 1995) 描述了这种移植了 CDR 的抗体在治疗类风湿性关节炎中的用途。US-A-5 919 452 公开了抗-TNF 嵌合抗体及其在治疗与 TNF 存在有关的病状中的用途。

人们 (Beutler 等, *Science*, 234, 470-474, 1985) 已经提出了 TNF $\alpha$  的抗体在预防和治疗内毒素性休克中的用途。Bodmer 等, (*Critical Care Medicine*, 21, S441-S446, 1993) 和 Wherry 等,



(Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) 讨论了抗-TNF  $\alpha$  抗体在治疗脓毒性休克中的治疗潜力。Kirschenbaum 等 (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998) 也讨论了抗-TNF  $\alpha$  抗体在治疗脓毒性休克中的用途。使用抗-TNF  $\alpha$  单克隆抗体可有效地治疗胶原-诱导的关节炎 (Williams 等 (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992))。

在类风湿性关节炎患者的滑液和外周血中可见到 TNF  $\alpha$  水平的升高。当把 TNF  $\alpha$  阻断剂给予患类风湿性关节炎的患者时, 它们可减轻炎症, 改善症状并延缓关节的损害 (McKown 等 (Arthritis Rheum., 42, 1204-1208, 1999))。

Feldman 等 (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini 等 (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) 和 Feldman 等 (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997) 讨论了抗-TNF  $\alpha$  抗体在治疗类风湿性关节炎和克罗恩氏病中的用途。用于这种治疗的 TNF  $\alpha$  抗体通常是嵌合抗体, 如 US-A-5 919 452 中描述的那些。

目前, 已经批准了两种 TNF  $\alpha$  阻断产品用于治疗类风湿性关节炎。首先, 是 Immunex Corporation 销售的 Enbrel™, 称作 etanercept。它是一种含两个 p75 可溶性 TNF-受体域的重组融合蛋白, 该 TNF-受体域与人免疫球蛋白的 Fc 部分相连。第二, 是 Centocor Corporation 销售的 Remicade™, 称作 infliximab。它是一种具有鼠科动物抗-TNF  $\alpha$  可变域和人 IgG1 不变域的嵌合抗体。

与导出可变域或 CDR 的抗体相比, 现有技术中的抗-TNF  $\alpha$  抗体分子对 TNF  $\alpha$  的亲合力降低, 且其通常是在哺乳动物的细胞中产生的, 造价昂贵。Stephens 等, (Immunology, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570 和 GB-A-2 297 145 描述了现有技术中的抗-TNF  $\alpha$  抗体。

因而, 需要一种治疗慢性炎症疾病的抗体分子, 其可以重复地使用, 并可以很容易地, 有效地生产。还需要一种抗体分子, 其对 TNF  $\alpha$  具有高亲合力, 而对人具有低免疫原性。

在第一个方面中, 本发明提供一种对 TNF  $\alpha$  具有特异性的抗体分子, 其包含一个重链, 其中的可变域包含一 CDR (Kabat 等 (supra) 定义的), 该 CDR 具有图 3 (SEQ ID NO: 1) 所列 CDRH1 的 H1 序列, 图 3 (SEQ ID NO: 2) 所列 CDRH2 的 H2' 序列或图 3 (SEQ ID NO: 7) 所列

CDRH2 的 H2 序列, 或图 3 (SEQ ID NO: 3) 所列 CDRH3 的 H3 序列。

本发明第一方面抗体分子的重链可变域包含至少一个选自 H1, H2' 或 H2 和 H3 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 3) 的 CDR。优选地, 该抗体分子的重链可变域中包含至少两个, 更优选全部三个 CDR。

在本发明的第二个方面中, 提供一种对人 TNF $\alpha$  具有特异性的抗体分子, 其包含一个轻链, 其中的可变域含一 CDR (如 Kabat 等 (supra) 所定义的), 该 CDR 具有图 3 (SEQ ID NO: 4) 所列 CDRL1 的 L1 序列, 图 3 (SEQ ID NO: 5) 所列 CDRL2 的 L2 序列, 或图 3 (SEQ ID NO: 6) 所列 CDRL3 的 L3 序列。

本发明第二方面抗体分子的轻链可变域包含至少一个选自 L1, L2 和 L3 (SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6) 的 CDR。优选地, 该抗体分子的轻链可变域中包含至少两个, 更优选全部三个 CDR。

优选本发明第一和第二方面的抗体分子分别具有一个互补的轻链或一个互补的重链。

优选地, 本发明第一或第二方面的抗体分子包含一个重链, 其中的可变域包含一 CDR (Kabat 等 (supra) 定义的), 该 CDR 具有图 3 (SEQ ID NO: 1) 所列 CDRH1 的 H1 序列, 图 3 (SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 7) 所列 CDRH2 的 H2' 或 H2 序列, 或图 3 (SEQ ID NO: 3) 所列 CDRH3 的 H3 序列, 和一个轻链, 其中的可变域包含一 CDR (如 Kabat 等 (supra) 所定义的), 该 CDR 具有图 3 (SEQ ID NO: 4) 所列 CDRL1 的 L1 序列, 图 3 (SEQ ID NO: 5) 所列 CDRL2 的 L2 序列, 或图 3 (SEQ ID NO: 6) 所列 CDRL3 的 L3 序列。

SEQ ID NO: 1 和 3-7 及图 3 中所列的 CDR 均来源于小鼠的单克隆抗体 hTNF40。然而, SEQ ID NO: 2 是由杂种 CDR 组成的。该杂种 CDR 包含部分来源于小鼠单克隆抗体 hTNF40 的重链 CDR2, 和部分来源于人类 3 组种系 V 区序列的重链 CDR2。

小鼠 hTNF40 抗体可变域的全序列在图 6 (轻链) (SEQ ID NO: 99) 和图 7 (重链) (SEQ ID NO: 100) 中列出。下面称此小鼠抗体为“供体抗体”。

本发明第一或第二方面的第一个优选实施例是小鼠单克隆抗体 hTNF40, 其具有图 6 (SEQ ID NO: 99) 和图 7 (SEQ ID NO: 100) 中分

别列出的轻链和重链可变域序列。hTNF40 的轻链不变区是  $\kappa$ ，重链不变区是 IgG2a。

在第二个优选实施例中，本发明第一或第二方面的抗体是一种嵌合的小鼠/人抗体分子，此处称其为嵌合 hTNF40 抗体分子。该嵌合抗体分子包含小鼠单克隆抗体 hTNF40 (SEQ ID NO: 99 和 100) 的可变域和人的不变域。优选地，该嵌合 hTNF40 抗体分子的轻链中包含人 C  $\kappa$  域 (Hieter 等, Cell, 22, 197-207, 1980; Genbank accession number J00241)，重链中包含人  $\gamma$  4 域 (Flanagan 等, Nature, 300, 709-713, 1982)。

在第三个优选实施例中，本发明第一和第二方面的抗体是一种移植了 CDR 的抗体分子。此处使用的术语“移植了 CDR 的抗体分子”指的是这样一种抗体分子，其中的重链和/或轻链包含一个或多个来源于供体抗体（例如，鼠科动物单克隆抗体）的 CDR（包括，如果期望，一种杂种 CDR），其中的供体抗体被移植到受体抗体（例如，人的抗体）的重链和/或轻链可变区构架中。

优选地，这种移植了 CDR 的抗体有一个可变域，其包含人的受体构架区和上述一个或多个供体 CDR。

当移植了 CDR 时，任一适当的受体可变区构架序列均可采用，只要注意到 CDR 从中衍生的供体抗体的种类/类型，包括小鼠，灵长类动物和人的构架区。用于本发明的人构架的实施例是 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY 和 POM (Kabat 等 (supra))。例如，KOL 和 NEWM 可用于重链，REI 可用于轻链，EU, LAY 和 POM 既可用于重链又可用于轻链。轻链的优选构架区是图 1 (SEQ ID NOS: 83, 85, 87 和 89) 所示人类 1 组构架区。重链的优选构架区是图 2 (SEQ ID NOS: 91, 93, 95 和 97 及 SEQ ID NOS: 106, 107, 108 和 109) 分别所示的人类 1 组和 3 组的构架区。

在本发明移植了 CDR 的抗体中，优选将具有与供体抗体链同源的抗体作为受体抗体使用，其具有。受体的重链和轻链并不需要来源于相同的抗体，且可以，如果需要，包含复合链，其中该复合链具有来源于不同链的构架区。

且，在本发明移植了 CDR 的抗体中，构架区不需要具有与受体抗体的那些序列完全相同的序列。例如，可把稀有残基变为就受体链的

种类或类型而言更经常出现的残基。选择性地，可改变受体构架区中选定的残基，以便使它们与在供体抗体相同位置发现的残基相一致。应使这种改变保持在最小，从而恢复供体抗体的亲和力。在 W091/09967 中提出了一种选择受体构架区中需改变的残基的方案。

优选地，在本发明移植了 CDR 的抗体分子中，如果受体重链具有人类 1 组的构架区（图 2 所示）（SEQ ID NOS: 91, 93, 95 和 97），那么除一种或多种供体 CDR 之外，重链的受体构架区还包含 28, 69 和 71 位的供体残基（根据 Kabat 等（supra））。

选择性地，如果受体重链具有 1 组的构架区，那么除一种或多种供体 CDR 之外，重链的受体构架区还包含 28, 38, 46, 67, 69 和 71 位的供体残基（根据 Kabat 等（supra））。

优选地，在本发明移植了 CDR 的抗体分子中，如果受体重链具有人类 3 组的构架区（图 2 所示）（SEQ ID NOS: 106, 107, 108 和 109），那么除一种或多种供体 CDR 之外，该重链的受体构架区还包含 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 和 78 位的供体残基（根据 Kabat 等（supra））。

优选地，在本发明移植了 CDR 的抗体分子中，如果受体轻链具有人类 1 组的构架区（图 1 所示）（SEQ ID NOS: 83, 85, 87 和 89），那么该轻链的受体构架区还包含 46 和 60 位的供体残基（根据 Kabat 等（supra））。

供体残基是来源于供体抗体，即，CDR 最初从中衍生的抗体的残基。

本发明的抗体分子可包含：具有全长重链和轻链的完整抗体分子；其片段，如 Fab，修饰的 Fab，Fab'，F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 片段；轻链或重链的单体或二聚体；单链抗体，例如单链的 Fv，其中重链和轻链的可变域是通过肽键连接的。类似地，重链和轻链的可变域可与其它抗体适当地结合。

本发明优选的抗体分子是 Fab 片段。优选的 Fab 片段有一个重链和一个轻链，该重链具有 SEQ ID NO: 111 所列的序列，该轻链具有 SEQ ID NO: 113 所列的序列。优选 SEQ ID NO: 111 和 SEQ ID NO: 113 中所列的氨基酸序列分别是由 SEQ ID NO: 110 和 SEQ ID NO: 112 中所列的核苷酸序列编码的。

选择性地，优选本发明的抗体分子是一种修饰的 Fab 片段，其中的修饰是指将一个或多个氨基酸添加到片段重链的 C-端，从而与效应

分子或报道分子相连接。优选地，附加的氨基酸形成含一个或两个半胱氨酸残基的修饰铰链区，从而可与效应分子或报道分子相连接。这种修饰的 Fab 片段优选具有一个重链和一个轻链，该重链具有 SEQ ID NO:115 所列的序列，该轻链具有 SEQ ID NO:113 所列的序列。SEQ ID NO:115 中所列的氨基酸序列优选是由 SEQ ID NO:114 中所列的核苷酸序列编码的。

优选的效应子是一种聚合物分子，其可以与修饰的 Fab 片段相连接，以增加它在体内的半衰期。

该聚合物分子通常可以是一种合成的或天然存在的聚合物，例如，任选取代的直链或支链的聚亚烷基，聚亚烯基或聚亚氧烷基的聚合物，或支链或无支链的多糖，例如，同-或杂-多糖。

存在于上述合成聚合物上的特殊任选取代基包括一个或多个羟基，甲基或甲氧基。合成聚合物的特殊实施例包括任选取代的直链或支链的聚(乙二醇)，聚(丙二醇)，聚(乙烯醇)或其衍生物，特别是任选取代的聚(乙二醇)，如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。天然存在的特殊聚合物包括乳糖，直链淀粉，葡聚糖，糖原或其衍生物。此处使用的“衍生物”可包括反应性衍生物，例如巯基-选择性的反应基团，如马来酰亚胺等。该反应基团可直接或通过连接区段与聚合物相连。我们期望在某些例子中，作为抗体片段和聚合物之间的连接基团，这种基团的残基可形成产物的一部分。

聚合物的大小可根据需要而变化，但平均分子量通常在 500Da-50000Da 之间，优选在 5000-40000Da，更优选 25000-40000Da。聚合物的大小可根据产品的用途而选择。因而，例如，假如想使产物离开循环，渗透组织中，例如用于治疗肿瘤，可使用小分子量的聚合物，例如分子量为 5000Da 的聚合物。为使产物留在循环中，可使用分子量较高的聚合物，例如分子量为 25000Da-40000Da 的聚合物。

特别优选的聚合物包括聚亚烷基聚合物，如聚(乙二醇)或，特别是，甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物，特别是具有约 25000Da-约 40000Da 分子量的聚合物。

附着在修饰抗体片段上的各聚合物分子可与片段中半胱氨酸残基的硫原子共价连接。该共价键通常是二硫键或，特别是，硫-碳键。

需要时，该抗体片段可具有一个或多个与其连接效应分子或报道

分子。该效应分子或报道分子可通过片段中任一可利用的氨基酸侧-链或末端氨基酸官能团，例如任一游离氨基，亚氨基，羟基或羧基与抗体片段连接。

在制备上述聚合物-修饰的抗体片段时，可将活化的聚合物用作起始材料。该活化聚合物可以是任一含巯基反应基团的聚合物，如 $\alpha$ -卤羧酸或酯，例如，碘乙酰胺，酰亚胺，例如马来酰亚胺，乙烯基砷或二硫化物。这种起始材料可从商业上得到（例如，从 Shearwater Polymers Inc., Huntsville, Al, USA）或使用常规的化学方法从商业上可得到的起始物质制备。

关于连接聚（乙二醇）（PEG）部分，可参考“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”，1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, “Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”，1997, J. Milton Harris 和 S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC 和“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”，1998, M. Aslam 和 A. Dent, Grove Publishers, New York.

如果希望得到连接到效应分子或报道分子上的抗体片段，则可通过标准的化学或重组 DNA 方法制备，其中抗体片段是在与活化的聚合物反应之前或之后，直接或经由偶联剂与效应分子或报道分子连接的。特殊的化学方法包括，例如，W093/06231, W092/22583, W089/00195 和 W089/01476 中描述的那些。选择性地，如果效应分子或报道分子是一种蛋白或多肽，那么可以使用重组 DAN 方法，如 W086/01533 和 EP-A-0392745 所描述的方法得到该键。

优选地，本发明修饰的 Fab 片段是根据 EP-A-0948544 中公开的方法 PEG 化的（即，PEG（聚（乙二醇）与其共价连接）。本发明优选的抗体分子是图 13 所示的 PEG 化的修饰 Fab 片段。如图 13 所示，该修饰的 Fab 片段具有一个与修饰铰链区中的单巯基共价连接的马来酰亚胺基团。赖氨酸残基与马来酰亚胺基团共价连接。赖氨酸残基的各胺基与分子量约为 20,000Da 的甲氧基聚（乙二醇）聚合物相连接。因此，整个效应分子总的分子量约为 40,000Da。

优选地，在图 13 所示的化合物中，抗体部分的重链具有 SEQ ID

NO:115 所列的序列，而轻链具有 SEQ ID NO:113 所列的序列。此处，称此化合物为 CDP870。

本发明抗体分子的不变区，如果存在，可考虑抗体分子的建议功能，特别是根据建议的效应子功能而选择。例如，该不变区域可以是人 IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM 域。特别是，当抗体分子用于治疗用途并需要抗体的效应子功能时，可使用人 IgG 不变区域，特别是 IgG1 和 IgG3 的同种型。选择性地，当抗体分子用于治疗目的但不需要抗体的效应子功能，例如简单的阻断 TNF $\alpha$  活性时，可使用 IgG2 和 IgG4 的同种型。

且，本发明的抗体分子可具有与其连接的效应分子或报道分子。例如，它可具有一个大环，用于螯合通过共价桥结构与其连接的重金属原子，或毒素，如蓖麻毒蛋白。选择性地，可将重组 DNA 技术用于生产抗体分子，其中完整免疫球蛋白分子的 Fc 片段 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> 和铰链域)，CH<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub> 域或 CH<sub>3</sub> 域已经被替换为，或通过肽键附着于，功能性的非-免疫球蛋白，如酶或毒素分子上。

本发明的抗体分子优选具有至少  $0.85 \times 10^{-10} \text{M}$ ，更优选至少  $0.75 \times 10^{-10} \text{M}$ ，最优选至少  $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  的结合亲和力。(本发明优选的人源化抗体分子，如下所述，具有约  $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  的亲和力，其比它从中衍生的鼠科动物单克隆抗体的亲和力要好。鼠科动物抗体的亲和力约为  $0.85 \times 10^{-10} \text{M}$ 。)

优选地，本发明的抗体分子包含轻链可变域 hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) 和重链可变域 gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11)。这些轻链和重链可变域的序列分别在图 8 和 11 中列出。

本发明还涉及本发明抗体分子的变体，其对 TNF $\alpha$  的亲和力提高。这种变体可通过许多亲和力成熟方案得到，该方案包括使 CDR 变异 (Yang 等, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), 链改组 (Marks 等, *Biol/Technology*, 10, 779-783, 1992), 使用大肠杆菌的增变菌株 (Low 等, *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), DNA 改组 (Patten 等, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), 噬菌体展示 (Thompson 等, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) 和有性 PCR (Cramer 等, *Nature*, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等 (*supra*) 讨论了这些亲和力成熟的方法。

本发明还提供一种编码本发明抗体分子重链和/或轻链的 DNA 序列。

优选地，该 DNA 序列编码本发明抗体分子的重链或轻链。

在其中一个优选实施方案中，该 DNA 序列编码轻链，且包含 SEQ ID NO: 8 (hTNF40-gL1) 或 SEQ ID NO: 9 (h-TNF40-gL2) 所列的序列或其简并等价物。

在另一个优选实施方案中，该 DNA 序列编码重链，且包含 SEQ ID NO: 10 (gh1hTNF40.4) 或 SEQ ID NO: 11 (gh3hTNF40.4) 所列的序列或其简并等价物。

本发明的 DNA 序列可包含合成的 DNA，例如通过化学方法生产的，cDNA，基因组 DNA 或其任意的组合。

本发明还涉及一种包含本发明一个或多个 DNA 序列的克隆或表达载体。优选地，该克隆或表达载体包含两个 DNA 序列，分别编码本发明抗体分子的轻链和重链。

在优选实施方案中，本发明提供一种含本发明 DNA 序列的大肠杆菌表达载体。优选地，该表达载体是图 22 中所示的 pTTO (CDP870)。

本发明还包含图 19 所示的载体 pDNAbEng-G1。

构造载体的普通方法，转染方法和培养方法对于本领域的那些技术人员来说是熟知的。这方面的参考文献是“Current Protocols in Molecular Biology”，1999，F.M. Ausubel (ed)，Wiley Interscience，New York 和 Cold Spring Harbor Publishing 的 Maniatis Manual。

编码本发明抗体分子的 DNA 序列可通过本领域技术人员熟知的方法得到。例如，编码部分或全部抗体重链和轻链的 DNA 序列可根据需要从预定的 DNA 序列，或根据相应的氨基酸序列而合成。

对于本领域的那些技术人员来说，编码受体构架序列的 DNA 可广泛地得到，且可以根据它们的已知氨基酸序列很容易地合成。

分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明抗体分子的 DNA 序列。可使用寡核苷酸合成技术完全或部分地合成所期望的 DNA 序列。还可适当地使用定点诱变及聚合酶链反应 (PCR) 技术。

任一适当的宿主细胞/载体系统均可用于表达编码本发明抗体分子的 DNA 序列。细菌如大肠杆菌，及其它的微生物系统，可部分用于编码抗体片段，如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段，特别是 Fv 片段和单链抗体片段，



例如，单链的 Fvs。真核生物，如哺乳动物的宿主细胞表达系统可用于生产较大的抗体分子，包括完整抗体分子。适当的哺乳动物宿主细胞包括 CHO，骨髓瘤或杂交瘤细胞。

本发明还提供一种生产本发明抗体分子的方法，包含在适于从编码本发明抗体分子的 DNA 产生蛋白表达的条件下，培养含本发明载体的宿主细胞，并分离该抗体分子。

生产本发明抗体分子的优选方法包含在适于从 DNA 序列产生蛋白表达的条件下，培养含大肠杆菌表达载体的大肠杆菌，其中的大肠杆菌表达载体包含本发明的 DNA 序列，然后分离该抗体分子。该抗体分子可从细胞分泌，或通过适当的信号序列而被导向胞质。选择性地，该抗体分子可在细胞的胞质内积聚。优选地，该抗体分子被导向胞质。根据所生产的抗体分子及所使用的方法，可使抗体分子重折叠并接受功能性构像。使抗体分子重折叠的方法对于本领域的那些技术人员来说是熟知的。

该抗体分子可仅仅包含一个重链或轻链的多肽，其中编码序列的一个重链或轻链多肽需用于转染宿主细胞。为了生产既含重链又含轻链的产物，可用两个载体转染细胞系，其中第一个载体编码轻链的多肽，第二个载体编码重链的多肽。选择性地，可使用单个载体，该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

本发明还提供一种治疗或诊断组合物，其包含本发明的抗体分子及药学上可接受的赋形剂，稀释剂或载体。

本发明还提供一种制备治疗或诊断组合物的方法，包括将本发明的抗体分子与药学上可接受的赋形剂，稀释剂或载体混合。

该抗体分子在治疗或诊断组合物中可以是单一的活性成分，或与其它活性成分，包括其它的抗体成分，例如抗-T 细胞，抗-IFN  $\gamma$  或抗-LPS 抗体，或非-抗体成分如黄嘌呤组合。

优选该药物组合物包含治疗有效量的本发明的抗体。此处使用的术语“治疗有效量”指的是治疗，改善或预防目标疾病或病症，或显示可检测的治疗或预防效果所需的治疗剂的量。对任一抗体而言，治疗的有效剂量最初可在细胞培养试验或动物模型，通常是啮齿类动物，兔子，狗，猪或灵长类动物中进行估量。该动物模型可用于确定适宜的浓度范围和给药途径。这种信息还可用于确定人的有效给药剂

量和给药途径。

人类受试者准确的有效量取决于疾病状况的严重性，受试者的一般健康状况，受试者的年龄，体重和性，饮食，给药时间和频率，药物的组合，反应敏感性和对治疗的耐受性/反应。此剂量可通过常规的试验并在临床医师的判断范围内确定。通常，有效剂量为 0.01mg/kg-50mg/kg，优选 0.1mg/kg-20mg/kg，更优选约 15mg/kg。如下列实施例所示，已经将 1, 5 和 20mg/kg 的给药剂量用于治疗患类风湿性关节炎的患者。

可将组合物单独给予患者，或与其它药剂，药物或激素一起给药。

本发明抗体分子的给药剂量取决于所治病症的特性，抗体分子是用于预防还是治疗所存在的病症，待中和的 TNF $\alpha$  水平高于或期望高于的水平程度。

因而，例如，当该产品用于治疗或预防慢性炎症性疾病，如类风湿性关节炎时，本发明抗体分子的适宜剂量为 0.5-50mg/kg，更优选 1-20mg/kg，最优选约 15mg/kg。给药频率取决于抗体分子的半衰期及其药效的持续时间。

如果抗体分子的半衰期较短（例如 2-10 小时），则可以每天给药一次或多次。选择性地，如果抗体分子的半衰期较长（例如 2-15 天），则只需每天，每周，甚至每 1 个月或 2 个月给药一次。

该药物组合物还可以包含用于给予抗体的药学上可接受的载体。该载体自身不应诱导生产对接受组合物的个体有害的抗体，且该载体应是无毒的。适宜的载体可以是大的，缓慢代谢的大分子，如蛋白，多肽，脂质体，多糖，聚乳酸，聚乙二醇酸，聚合氨基酸，氨基酸共聚物和非活性的病毒颗粒。

也可以使用药学上可接受的盐，例如无机酸盐，如盐酸盐，氢溴酸盐，磷酸盐和硫酸盐，或有机酸盐，如醋酸盐，丙酸盐，丙二酸盐和苯甲酸盐。

治疗组合物中药学上可接受的载体还可以附带地包含液体，如水，盐水，甘油和乙醇。附带地，辅助物质，如湿润剂或乳化剂或 pH 缓冲物质，也可存在于这种组合物中。这种载体可将药物组合物制成适于患者摄入的片剂，丸剂，糖衣丸剂，胶囊，液体，凝胶，糖浆，浆和混悬液。

优选的给药形式包括适于非肠道给药的形式，例如，通过注射或输注，如快速浓注或连续的输注。当产品用于注射或输注时，它可以是油性或水性介质中的混悬液，溶液或乳状液，且它可以包含 formulatory 剂，如混悬剂，防腐剂，稳定剂和/或分散剂。选择性地，该抗体分子可以是干燥形式，使用前用适当的无菌液体再组成。

一旦配制好后，可将本发明的组合物直接给予患者。接受治疗的患者可以是动物。然而，优选将该组合物给予人类患者。

本发明的药物组合物可通过任一途径给药，包括，但不限制于，静脉内，肌内，房内，髓内，鞘内，心室内，透皮，经皮（例如，见 W098/20734），皮下，腹膜内，鼻内，肠内，局部，舌下，阴道内或直肠给药途径。Hyposprays 也可用于给予本发明的药物组合物。代表性地，可将该治疗组合物制备成可注射的液体溶液或混悬液。还可以制备用于注射前配制于液体赋形剂的溶液或混悬液的固体形式。

组合物的直接传递通常可通过皮下，腹膜内，静脉内或肌内注射来完成，或将组合物传递到组织的间隙空间。还可以将该组合物给药到损伤中。治疗方案可以是单一给药或复合给药。

期望组合物中的活性成分是抗体分子。这样，其在胃肠道中的降解令人怀疑。因而，如果该组合物是通过胃肠道途径给药，那么该组合物需包含防止抗体降解，但一旦从胃肠道吸收则释放该抗体的药剂。

有关药理学上可接受载体的彻底讨论见 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J. 1991)。

通过基因治疗给予本发明的抗体也是可以想到的。为了实现这一点，将在适当 DNA 组分的控制下编码抗体分子重链和轻链的 DNA 序列引入到患者中，从而自 DNA 序列表达抗体链并原位装配 (in situ assembly)。

本发明还提供用于治疗 TNF $\alpha$  介导的疾病的抗体分子。

本发明进一步提供本发明抗体分子在制备治疗 TNF $\alpha$  介导疾病的药剂中的用途。

本发明的抗体分子可用于任意一种治疗当中，其中希望能降低存在于人或动物体中生物活性的 TNF $\alpha$  的水平。该 TNF $\alpha$  可在体内循环，或以不期望的高水平存在于体内的特殊位置。

例如，TNF $\alpha$ 水平的升高参与急性和慢性的免疫和免疫调节疾病，感染包括脓毒性，内毒素性的和心血管性休克，炎症疾病，神经变性疾病，恶性疾病和酒精诱导的肝炎。与TNF $\alpha$ 水平升高有关的多种疾病的描述在US-A-5 919 452中提出。本发明的抗体分子可用于治疗TNF $\alpha$ 介导的疾病。可用本发明抗体分子治疗的，特别相关的疾病包括脓毒症，充血性心力衰竭，脓毒性或内毒素性的休克，恶病质，成人呼吸窘迫综合症，AIDS，变态反应，牛皮癣，TB，炎性骨疾病，血液凝聚病，烧伤，器官或组织移植后的排斥反应发作，克罗恩氏病和自身免疫疾病，如甲状腺炎和类风湿性-和骨-关节炎。

附带地，该抗体分子或组合物还可用于：减轻在肿瘤治疗过程中与TNF $\alpha$ 产生有关的副作用；消除或减轻与使用抗-淋巴细胞抗体治疗或预防移植排斥相关的休克症状；或治疗多-器官衰竭。

本发明的抗体分子优选用于治疗类风湿性-或骨-关节炎。

本发明还提供一种治疗患TNF $\alpha$ 介导的疾病或具有患TNF $\alpha$ 介导疾病风险的人或动物受试者的方法，该方法包括给予受试者有效量的本发明的抗体分子。

本发明的抗体分子还可用于诊断，例如体内诊断，及反映疾病的状况，其中该疾病涉及TNF $\alpha$ 水平的升高。

本发明还提供一种含杂种CDR的抗体分子，其中的CDR含截短的供体CDR序列，其中截短的供体CDR的缺失部分被不同的序列代替，并形成功能性的CDR。此处使用的术语“杂种CDR”指的是一种含供体CDR的CDR，其中在一个或多个位置，例如，在其一个或两个末端平截该供体CDR。用不同的序列代替截短的供体CDR的缺失部分，从而形成一个完整的，功能性的CDR。与完整的供体CDR相比，该杂种CDR具有至少一个氨基酸的改变。代替CDR截短部分的序列可以是任一序列。优选地，CDR序列的非-供体部分来源于抗体，而该抗体又是抗体分子构架区从中衍生的抗体，如种系抗体序列。

人们已经发现含杂种CDR的抗体分子基本上保留了与含完整供体CDR的抗体分子相同的结合亲和力。此处使用的术语“基本上相同的结合亲和力”指的是与相应的含完整供体CDR的抗体分子相比，至少70%，更优选至少85%，最优选至少95%相同的结合亲和力。如上所述，在某些例子中，本发明抗体的亲和力可比供体抗体的亲和力大很多。

杂种 CDR 的使用提供了这样一种有利之处，即减少了存在于抗体分子中外源（即供体）序列的量，且与相应含完整供体 CDR 的抗体分子相比，增加了抗体分子的结合亲和力。

任一抗体分子的 CDR 均可以是杂种的。优选在抗体分子中重链的 CDR2 是杂种。

优选平截供体 CDR 的 1-8 个氨基酸，更优选 4-6 个氨基酸。进一步优选在 CDR 的 C-端进行平截。

根据 CDR 截短部分的序列和代替缺失部分的不同序列的序列，可进行多种氨基酸的改变。优选进行至少 2 个，更优选至少 3 个，最优选至少 4 个氨基酸的改变。

本发明此方面的特殊实施方案是本发明第一方面的抗体，其中重链中的第二个 CDR 具有 SEQ ID NO: 2 所列的序列。与部分 CDR 从中衍生出的供体抗体相比，其对抗原的亲和力更好。

本发明还提供一种核酸序列，其编码含本发明杂种 CDR 的抗体分子。

本发明还提供一种含核酸序列的表达载体，其中的核酸序列编码含本发明杂种 CDR 的抗体分子。

本发明还提供一种用本发明载体转染的宿主细胞。

本发明还提供一种生产含杂种 CDR 的抗体分子的方法，包含培养本发明的宿主细胞，并分离该抗体分子。

下面，参考附图并结合实施例对本发明进行进一步的描述，其中：

图 1 表示与 hTNF40 轻链（SEQ ID NOS: 83-90）的构架区相比，人轻链 1 亚组的构架区；

图 2 表示与 hTNF40 重链（SEQ ID NOS: 91-98 及 106-109）的构架区相比，人重链 1 亚组和 3 亚组的构架区；

图 3 表示 hTNF40CDR (SEQ ID NOS: 1-7) 的氨基酸序列，其中 CDR H2' 是一种杂种 CDR，其中 C-端的六个氨基酸来源于人 3 亚组种系抗体的 H2 CDR 序列，并在氨基酸下划线，其中该氨基酸变为由此杂交所产生的序列；

图 4 表示载体 pMR15.1；

图 5 表示载体 pMR14；

图 6 表示鼠科动物 hTNF40V1 (SEQ ID NO: 99) 的核苷酸序列及预测

的氨基酸序列;

图 7 表示鼠科动物 hTNF40Vh (SEQ ID NO: 100) 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列;

图 8 表示鼠科动物 hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列;

图 9 表示鼠科动物 hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9) 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列;

图 10 表示鼠科动物 gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10) 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列;

图 11 表示鼠科动物 gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列;

图 12 表示载体 CTIL5-gL6;

图 13 表示称作 CDP870 的化合物的结构, 该化合物包含来源于抗体 hTNF40 的 Fab 片段, 其中抗体 hTNF40 是经由半胱氨酸残基与赖氨酰-马来酰亚胺键共价连接的, 其中各个赖氨酰残基上的氨基与甲氧基 PEG 残基共价连接, 其中的 n 约为 420;

图 14 表示载体 pTTQ9;

图 15 表示 OmpA 寡核苷酸连接物 (SEQ ID NO: 101) 的序列;

图 16 表示载体 pACYC184;

图 17 表示载体 pTTO-1;

图 18 表示载体 pTTO-2;

图 19 表示载体 pDNAbEng-G1;

图 20 表示寡核苷酸弹夹, 该弹夹编码大肠杆菌修饰的 Fab 表达的不同基因间序列 (SEQ ID NO: 102-105);

图 21 表示 IGS 变体的胞质修饰的 Fab 积聚;

图 22 表示载体 pTTO (CDP870);

图 23 表示用不同剂量的 CDP870 和安慰剂治疗的患者的疾病活动性值 (DAS)。提出中值和 IQ 范围。小方块代表安慰剂, 菱形代表 1mg/kg, 三角形代表 5mg/kg, 大方块代表 20mg/kg。

图 24 表示用不同剂量的安慰剂和 CDP870 治疗的患者的触痛关节数, 肿胀关节数, 疼痛值, 评估员对疾病活动性的综合评估, 改进的健康评估调查表 (HAQ), C 反应性蛋白 (CRP) 和血沉速率 (ESR)。提

出中值和 IQ 范围。小方块代表安慰剂，菱形代表 1mg/kg，三角形代表 5mg/kg，大方块代表 20mg/kg。

## 实施例

### 嵌合的 hTNF40 抗体分子的基因克隆和表达

#### 从 hTNF40 杂交瘤细胞制备 RNA

总的 RNA 是按照下列描述从  $3 \times 10^7$  个 hTNF40 杂交瘤细胞制备的。在生理盐水中清洗细胞并在 RNAzol (0.2ml/10<sup>6</sup> 个细胞) 中将其溶解。加入氯仿 (0.2ml/2ml 匀浆)，用力振荡该混合物 15 秒，然后将其放在冰上 15 分钟。在 Eppendorf 离心机中离心 15 分钟，使最终的水相和有机相分离，然后通过加入等体积的异丙醇使 RNA 从水相中沉淀出来。在冰上放置 15 分钟后，通过离心使 RNA 成团，用 70% 乙醇清洗，干燥，并将其溶解在无菌的，RNA 酶游离水中。RNA 的产量为 400 $\mu$ g。

#### hTNF40 Vh 和 V1 的 PCR 克隆

编码 hTNF40 重链和轻链可变域的 cDNA 序列是使用反向转录酶合成的，并产生存在于总 RNA 中的 mRNA 的单链 cDNA 模板，接下来用特异性的寡核苷酸引物在 cDNA 上进行聚合酶链反应 (PCR)。

##### a) cDNA 的合成

cDNA 是在含下列试剂的 20 $\mu$ l 反应体积内合成的：50mM Tris-HCl pH8.3, 75mM KCl, 10mM 二硫苏糖醇, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM 脱氧核糖核苷酸盐, 20 个单位的 RNA 酶抑制剂, 75ng 的任意六核苷酸引物, 2 $\mu$ g 的 hTNF40 RNA 和 200 个单位的莫洛尼鼠科动物白血病病毒反向转录酶。在 42 $^{\circ}$ C 培养 60 分钟后，通过在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟而终止反应。

##### b) PCR

使用对重链和轻链具有特异性的引物组合，使 cDNA 的等分试样经历 PCR 反应。重链和轻链 5' 引物的核苷酸序列分别在表 1 和 2 中列出。这些序列均包含，适宜的，一个从 5' 端启动 7 个核苷酸的限制位点，序列为 GCCGCCACC (SEQ ID NO: 12)，以使生成的 mRNA，一个起始密码子和基于已知小鼠抗体前导肽序列的 20-30 个核苷酸的翻译达到最佳

(Kabat 等, Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

3'引物在表 3 中列出。轻链的引物越过抗体的 J-C 连接,且包含 Sp1I 酶的一个限制位点,从而促进 V1 PCR 片段的克隆。重链的 3'引物是一种越过抗体 J-C 连接的混合物。该 3'引物包括促进克隆的 ApaI 限制位点。引物的 3'区包含一混合序列,该混合序列是以在已知小鼠抗体中发现的那些 (Kabat 等, 1991, supra) 为基础的。

上述引物的组合可使 Vh 和 V1 的 PCR 产物直接被克隆适当的表达载体 (见下面),从而生产嵌合的 (小鼠-人) 的重链和轻链,且可使这些基因的 PCR 产物在哺乳动物细胞中表达,从而生产出所需同种型的嵌合抗体。

下面提出 PCR 的培养物 (100  $\mu$ l)。各反应物均包含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01% w/v 明胶, 0.25mM 脱氧核糖核苷三磷酸盐, 10pmoles 的 5'引物混合物 (表 4), 10pmoles 的 3'引物 (CL12 (轻链) 或 R2155 (重链) (表 3)), 1  $\mu$ l 的 cDNA 和 1 个单位的 Taq 聚合酶。在 95 $^{\circ}$ C 培养该反应物 5 分钟, 然后 94 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟。30 次循环之后, 通过在琼脂糖胶上进行电泳而分析各反应物的等分试样。来源于轻链库 1, 2, 和 7 的含 5'引物混合物的轻链反应物产生与全长 V1 片段大小相同的带, 而来源于重链反应库 3 的反应物则产生与 Vh 基因预期大小相同的片段。由于上述结果显示此带与杂交瘤细胞产生的轻链假基因相对应, 因而没有研究轻链库 1 引物生产的带。轻链库 7 引物所产生的带比库 2 引物所产生的带要弱, 因此没有研究它。仅研究了来源于轻链反应库 2 的带, 其是最强的带。

### c) PCR 片段的分子克隆

用 BstBI 和 Sp1I 酶消化在轻链反应库 2 中产生的 DNA 片段, 通过乙醇沉淀浓缩, 在 1.4% 琼脂糖胶上进行电泳, 回收在 400 个碱基对范围内的 DNA。通过将其连接到载体 pMR15.1 (图 4) 中而克隆该 DNA, 其中该载体已经被 BstBI 和 Sp1I 限制过了。连接之后, 将混合物转化大肠杆菌 LM 1035, 而来源于最终细菌群体的质粒通过用 BstBI 和 Sp1I 消化来筛选插入片段, 具有每一种连接的插入片段的代表, 进一



步通过核苷酸测序分析。

在类似的方法中，在重链反应库 3 中产生的 DNA 片段是用 HindIII 和 ApaI 消化的，并被克隆载体 pMR14 (图 5)，其中该载体已经被 HindIII 和 ApaI 限制过了。又，通过核苷酸测序分析含插入片段的代表性质粒。

#### d) 核苷酸序列的分析

使用引物 R1053 (见表 5) (其在 pMR14 的 HCMV 启动子的 3' 区中作为引物) 和 R720 (见表 5) (其在人 C- $\gamma$ 4 的 5' 区中作为引物，并通过 pMR14 上的 DNA 插入片段测序) 测序质粒 DNA，其中该质粒 DNA 来源于许多含 Vh 插入片段的分离物。人们已经发现，许多克隆中的 Vh 插入片段的核苷酸序列除信号肽和 J 区不同外，均是相同的。这表明所检验的克隆是独立的分离物，这是由于在 PCR 阶段，使用了来源于寡核苷酸混合物的不同引物。抗体 hTNF40 (hTNF40Vh) 重链可变域的所确定的核苷酸序列和所预测的氨基酸序列在图 7 (SEQ ID NO: 100) 中列出。

为了分析轻链的克隆，检验了用 R1053 (见表 5) 和 R684 (SEQ ID NO: 62) (其在人 C- $\kappa$  的 5' 区中作为引物，并通过 pMR15.1 上的 DNA 插入片段测序) 作为引物所得到的序列。由于在库 2 中反应，可类似地分析 V1 基因的核苷酸序列和所预测的氨基酸序列。又，人们还发现许多克隆中的 V1 插入片段的核苷酸序列除信号肽和 J 区不同之外，均是相同的，这些表明由于在 PCR 阶段使用了来源于寡核苷酸混合物的不同引物，所检验的克隆是独立的分离物。抗体 hTNF40 (hTNF40V1) 轻链可变域的确定的核苷酸序列和预测的氨基酸序列在图 6 (SEQ ID NO: 99) 中列出。

#### 表 1

小鼠重链 5' 区的寡核苷酸引物。

- CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEQ ID NO:13)  
 CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEQ ID NO:14)  
 CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTT3' (SEQ ID NO:15)  
 CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEQ ID NO:16)  
 CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEQ ID NO:17)  
 CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEQ ID NO:18)  
 CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEQ ID NO:19)  
 CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEQ ID NO:20)  
 CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEQ ID NO:21)  
 CH10 : 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCT3' (SEQ ID NO:22)  
 CH11 : 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEQ ID NO:23)  
 CH12 : 5'ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

上述各引物均具有加入到其 5'端的序列  
 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:25)

## 表 2

小鼠轻链 5'区的寡核苷酸引物。

- CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:26)  
 CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEQ ID NO:27)  
 CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEQ ID NO:28)  
 CL4 : 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEQ ID NO:29)  
 CL5 : 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:30)  
 CL5A : 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:31)  
 CL6 : 5'ATGAGGT(T,G)C(T,C)(T,C)TG(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)CTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:32)  
 CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEQ ID NO:33)

- CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTCAAT3'(SEQ ID NO:34)
- CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)
- CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTT3' (SEQ ID NO:36)
- CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3'(SEQ ID NO:37)
- CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEQ ID NO:38)
- CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)
- CL13 : 5'ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)
- CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)
- CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)
- CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)
- CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)
- CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)
- CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

上述各引物均具有加入到其 5'端的序列

5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3'(SEQ ID NO: 47)。

### 表 3

小鼠 Vh 和 V1 基因 3'端的寡核苷酸引物。

轻链 (CL12):

5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEQ ID NO:48)

重链 (R2155):

5'GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA3'  
(SEQ ID NO:49)

### 表 4

a) 轻链 PCR 反应的 5'引物混合物

库 1: CL2

库 2: CL7

库 3: CL13

库 4: CL6

库 5: CL5A, CL9, CL17A

库 6: CL8

库 7: CL12A

库 8:

CL1, CL3, CL4, CL5, CL10, CL11, CL2B, CL14, CL15, CL16, CL17B, CL17C

#### b) 重链 PCR 反应的 5'引物混合物

库 1: CH1, CH2, CH3, CH4

库 2: CH5, CH6, CH7, CH8

库 3: CH9, CH10, CH11, CH12

#### 表 5

##### 用于核苷酸序列分析的引物

R1053 : 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEQ ID NO:50)

R720 : 5'GCTCTCGGAGGTGCTCCT3' (SEQ ID NO:51)

#### 嵌合基因活性的评估

嵌合基因的活性是通过在哺乳动物细胞中表达，纯化它们，并测定新合成抗体的数量而评估的。下面描述其操作方法，及用于抗体生物特性描述的细胞和生物化学测定法。

##### a) 嵌合 hTNF40 抗体分子的生产

用于生物评估的嵌合抗体是通过使用磷酸钙沉淀共-转染成中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞之后，瞬时表达适当的重链和轻链对而生产的。

在转染之前，使半-融合瓶的 CHO-L761 细胞接受胰蛋白酶作用，计算细胞数，每个 T75 瓶含  $10^7$  个细胞。

第二天，在转染之前 3 个小时，改变培养基。为了进行转染，将 1.25ml 各含 50  $\mu$ g 重链和轻链表达载体的 0.25M  $\text{CaCl}_2$  和 1.25ml 2xHBS (1 升水中含 16.36g NaCl, 11.0g HEPES 和 0.4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，并用 NaOH 调节 pH 值至 7.1) 混合，并立即加入到细胞的培养基中制备磷酸钙沉淀。在 37°C 的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 3 小时后，除去培养基和沉淀，通过在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中加入 15 ml 15% 的甘油 1 分钟来振荡

细胞。除去甘油，用 PBS 洗该细胞一次，并在 25ml 含 10mM 丁酸钠的培养基中培养 48-96 小时。通过结合并从蛋白 A-琼脂糖上洗脱而从培养基纯化抗体。

#### b) ELISA

为了进行 ELISA，用浓度为 5  $\mu\text{g/ml}$  的多克隆山羊抗-人 Fc 片段特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch, code 109-006-098) 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段的包被缓冲液 (15mM 碳酸钠, 35mM 碳酸氢钠, pH6.9) 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜覆盖 Nunc ELISA 平板。用蒸馏水清洗 5 次，除去未包被的抗体。将定量的样品和纯标准品稀释至在共轭缓冲液 (0.1M Tris-HCl, pH7.0, 0.1M NaCl, 0.2%v/v Tween 20, 0.2%w/v Hammersten 酪蛋白) 中的浓度约为 1  $\mu\text{g/ml}$ 。以 2-倍的稀释度在微量滴定板中滴定该样品，使得每个孔中的最终体积达到 0.1ml，室温下振荡培养该平板 1 小时。第一次培养后，用蒸馏水清洗该板 10 次，然后如前所述，用 0.1ml，在共轭缓冲液中的稀释度为 1:700 的小鼠单克隆抗-人  $\kappa$  (克隆 GD12) 过氧化物酶缀合抗体 (结合位点，密码 MP135) 培养该板 1 小时。再次清洗平板，并向各个孔中加入底物溶液 (0.1ml)。该底物溶液在 10ml 0.1M 醋酸钠/柠檬酸钠中，含 150 $\mu\text{l}$  N,N,N,N-四甲基联苯胺 (在 DMSO 中的浓度为 10mg/ml)，150 $\mu\text{l}$  过氧化氢 (30%的溶液)，pH6.0。使该板展开 5-10 分钟，直到 630nm 处的吸光度相对于最高标准约为 1.0。630nm 处的吸光度是使用平板阅读器测量的，而样品的浓度则是通过与标准的滴定曲线相对照而测定的。

#### c) 通过 BiaCore 分析测定亲和力常数

使用 BIA 技术调查研究 hTNF40 和人 TNF 之间的结合相互作用。使用标准的 NHS/EDC 化学过程，将 hTNF40 不变区的亲和纯化山羊多克隆抗体固定在葡聚糖聚合物传感器芯片的表面上。捕获相对低水平 (200-500RU) 的 hTNF40，以确保传质效率达到最小。捕获的 hTNF40 越过不同浓度的人 TNF，从而评估缔合动力学。注射配位体之后，缓冲液越过该表面，从而测量解离作用。计算固相 hTNF40 和人 TNF 之间相互作用的缔合和解离常数，得到  $K_D$  值。

### 实施例 1

#### hTNF40 的 CDR-移植

上面已经描述了 hTNF40 抗体重链和轻链可变区基因的分子克隆, 及其用于生产嵌合(小鼠-人)hTNF40 抗体的用途。鼠科动物 hTNF40 V1 和 Vh 的核苷酸和氨基酸序列分别在图 6 和 7 (SEQ ID NO: 99 和 100) 中列出。此实施例描述 hTNF40 抗体的 CDR-移植。

#### hTNF40 轻链的 CDR-移植

hTNF40 轻链的构架区与四个人轻链亚组的构架区的序列对比 (Kabat 等, 1991, *supra*) 显示了 hTNF40 与人轻链的亚组 1 中的抗体是最类似的。因此, 为了构造移植了 CDR 的轻链, 选择与人类 1 组共有序列的那些构架区相对应的构架区。

鼠科动物 hTNF40 构架区与共有序列人类 1 组轻链的氨基酸序列的对比在图 1 中列出, 其显示两个序列之间有 22 个不同之处(下面划线的部分)。就这些构架的任一不同之处对于抗原结合的贡献进行分析, 确定了 2 个用于研究的残基, 它们位于 46 和 60 位。根据此分析构造了两个移植了 CDR 的轻链的译本。第一个是 hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8), 残基 46 和 60 来源于 hTNF40 的轻链, 而第二个是 hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9), 除了 60 号残基之外, 所有残基均是人的共有序列, 而 60 号残基则来源于 hTNF40 的轻链。

#### 移植了 CDR 的轻链 hTNF40-gL1 的结构

hTNF40-gL1 的结构在下面详细给出。将下列重叠的寡核苷酸 (P7982-P7986) 用于聚合酶链反应 (PCR) 中, 从而装配出截短的移植轻链。所评估的片段缺少抗体前导序列和构架 1 开始的 17 个氨基酸。

**寡 1 P7982:**

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTAAC  
GTAGCCTGGTATCAGCAA3' (SEQ ID NO:52)

**寡 2 P7983:**

5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCITTTGGGGCTTACCTGGTTT  
TTGCTGATAACCAGGCTACGT3' (SEQ ID NO:53)

**寡 3 P7984:**

5' TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATAACAGGTTTCAGCGGATCCG  
GTAGTGGTACTGATTTAC3' (SEQ ID NO:54)

**寡 4 P7985**

5'GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGATCGTGAGGGT  
GAAATCAGTACCACTACCG3' (SEQ ID NO:55)

**寡 5 P7986:**

5'ATTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCGGT  
CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEQ ID NO:56)

**Fwd P7981:**

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (SEQ ID NO:57)

**Bwd P7980**

5'GAATTCGGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT3' (SEQ ID NO:58),

制备 100 $\mu$ l 的 PCR 反应物, 其包含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01%w/v 明胶, 0.25mM 脱氧核糖核苷三磷酸盐, 2pmoles 的 P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10pmoles 的 P7980, P7981 和 1 个单位的 Taq 聚合酶。该反应在 94 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟。30 次循环之后, 通过在琼脂糖胶上进行电泳而分析各反应物, 从凝胶上切除 PCR 片段, 并用 Mermaid 试剂盒回收。在适当的缓冲液中用 BstEII 和 SphI 酶限制回收的片段。最后, 使最终的产物经过琼脂糖胶电泳, 从凝胶切片回收 270 个碱基

对 DNA 片段, 并将其连接到载体 CTIL5-gL6(图 12)中, 该载体已经预先用相同的酶消化过了。上述载体提供缺失抗体前导序列和构架 1 开始的 17 个氨基酸。

该连接混合物用于转化大肠杆菌菌株 LM1035 及通过 PCR 分析得到的克隆, 限制酶消化和核苷酸测序。hTNF40-gL1 的 V1 区的核苷酸和氨基酸序列在图 8 中列出 (SEQ ID NO: 8)。

移植了 CDR 的轻链 hTNF40-gL2 的结构

使用 PCR 构造 hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9)。下列寡核苷酸用于引入氨基酸变化。

R1053: 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEQ ID NO:59)

R5350: 5'TCTAGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTGATGCAGCATAGAT  
CAGGAGCTTAGGAGC3' (SEQ ID NO:60)

R5349: 5'GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTCAGTGGCAGTGGATCA  
GGCACAGACTTTACCCTAAC3' (SEQ ID NO:61)

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

制备各 20  $\mu$ l 的两个反应物, 每个均包含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01%w/v 明胶, 0.25mM 脱氧核糖核苷三磷酸盐, 0.1  $\mu$ g hTNF40-gL1, 6pmoles 的 R1053/R5350 或 R5349/R684 和 0.25 个单位的 Taq 聚合酶。该反应在 94 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 循环 1 分钟。30 次循环之后, 通过在琼脂糖胶上进行电泳而分析各反应物, 并从凝胶切除 PCR 片段, 然后用 Mermaid 试剂盒回收。

使这些反应物的等分试样经历第二个 PCR 循环。100  $\mu$ l 该反应物含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01%w/v 明胶, 1/5 来源于第一组反应的各 PCR 片段, 30pmoles 的 R1053 和 R684, 和 2.5 个单位的 Taq 聚合酶。反应温度如上所述。PCR 之后, 先用苯酚/氯仿



提取该混合物，然后用氯仿提取，并用乙醇沉淀。通过离心回收乙醇沉淀，将其溶解在适当的缓冲液中，并用 BstEII 和 SphI 酶限制。最后，使最终的产物经过琼脂糖胶电泳，从凝胶切片回收 270 个碱基对 DNA 片段，并使其连接到载体 pMR15.1(图 4)中，该载体已经预先用相同的酶消化了。

该连接混合物用于转化大肠杆菌菌株 LM1035 及通过 PCR 分析的最终群体，限制酶消化和核苷酸测序。HTNF40-g1L2 的 V1 区的核苷酸和氨基酸序列在图 9 中列出 (SEQ ID NO:9)。

### HTNF40 重链的 CDR-移植

hTNF40 重链的 CDR-移植是使用与轻链相同的策略完成的。hTNF40 重链与属于 1 亚组的人重链最类似，因此选择人亚组 1 构架的共有序列来接受 hTNF40 重链的 CDR。

为了调查研究同源的人构架充当 CDR 移植的受体构架的要求，选择第二个构架，人类 3 组从而使 hTNF40 重链人源化。

hTNF40 与两个不同构架区的对比在图 2 中列出，从中可看出 hTNF40 与 32 位（下面划线的部分）的人 1 亚组共有序列不同，与 40 位的人 3 亚组共有序列不同（下面划线的部分）。在分析任一结果之后，可知使用 1 组构架将残基 28, 38, 46, 67 和 71 作为供体保留在移植了 CDR 的重链 gh1hTNF40.1，从而可使抗原结合。使用 3 组构架将残基 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 和 78 作为供体保留在移植了 CDR 的重链，gh3hTNF40.4 中。使用 1 组构架将残基 28, 69 和 71 作为供体保留在移植了 CDR 的重链，gh1hTNF40.4 中。

### 移植了 CDR 的重链 gh1hTNF40.4 的结构

gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10) 是在有适当引物参与的情况下，通过使重叠的寡核苷酸经历 PCR 而装配的。下列寡核苷酸用于 PCR 中：

#### 1 组移植物

## 寡 1 P7989:

5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG  
AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:63)

## 寡 2 P7990:

5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC  
GTGTTACAGACTATGGTA3' (SEQ ID NO:64)

## 寡 3 P7991:

5'CCAACCCATCCATTTCAAGGCCTTGTCCCGGGCCTGCTTGACCCAATTCATAC  
CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEQ ID NO:65)

## 寡 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEQ ID NO:66)

## 寡 5 P7992:

5'CCATGTATGCAGTGCGTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTT  
GAA3' (SEQ ID NO:67)

## 寡 6 P7993:

5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCGC  
AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:68)

## 寡 7 P7994:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG  
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO:69)

## Fwd: P7988:

5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:70)

## Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

类似的 100 $\mu$ l 反应物含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM

KCl, 0.01%w/v 明胶, 0.25mM 脱氧核糖核苷三磷酸盐, 2pmoles 的 P7989, P7990, P7991, P7995, P7992, P7993 和 P7994, 10pmoles 的 P7988, P7987 和 1 个单位的 Taq 聚合酶。反应在 94℃ 循环 1 分钟, 55℃ 循环 1 分钟, 72℃ 循环 1 分钟。30 次循环之后, 先用苯酚/氯仿(1/1) 提取反应物, 然后用氯仿提取, 并用乙醇沉淀。离心之后, 将 DNA 溶解在适当的限制缓冲液中, 并用 ApaI 和 KpnI 消化。从琼脂糖胶分离最终的片段, 并将其连接到 pMR14(图 5) 中, 该载体已经预先用相同的酶消化过了。当用 ApaI 和 KpnI 使 pMR14 裂开时, pMR14 包含人  $\gamma 4$  重链不变区, 该裂开的载体可接收消化的 DNA, 这样所消化 DNA 的 3'端在读框中与编码  $\gamma 4$  不变区序列的 5'端相连接。因此, 从此载体表达的重链是  $\gamma 4$  的同型。该连接混合物用于转化大肠杆菌菌株 LM1035, 并通过限制消化及核苷酸序列分析筛选最终的细菌群体。在此方法中, 鉴定了含 gh1hTNF40.4(图 10) (SEQ ID NO:10) 正确序列的质粒。

### 移植了 CDR 的重链 gh3hTNF40.4 的结构

gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11) 是在有适当引物参与的情况下, 通过使重叠的寡核苷酸经历 PCR 而装配的。下列寡核苷酸用于 PCR 中:

### 3 组移植物

**寡1 P7999:**

5'GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCTGAACCTCAG  
AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:72)

**寡2 P8000:**

5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCTGGTTACG  
TCTTCACAGACTATGGAA3' (SEQ ID NO:73)

**寡3 P8001**

5'CCAACCCATCCATTCAGGCCCTTCCCGGGGCCTGCTTAACCCAATTCATTC  
CATAGTCTGTGAAGACGT3' (SEQ ID NO:74)

**寡4 P7995:**

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEQ ID NO:66)

**寡5 P7997:**

5'GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGAATCTGCCCTT  
GAA3' (SEQ ID NO:75)

**寡6 P7998:**

5'CCAAGTCAACAGCATACTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC  
AGTGTAAT3' (SEQ ID NO:76)

**寡7 P7993:**

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG  
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO:77)

**Fwd P7996:**

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:78)

**Bwd P7987:**

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

100 $\mu$ l 的装配反应物含 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM

KCl, 0.01%w/v 明胶, 0.25mM 脱氧核糖核苷三磷酸盐, 2pmoles 的 P7999, P8000, P8001, P7995, P7997, P7998 和 P7993, 10pmoles 的 P7996, P7987 和 1 个单位的 Taq 聚合酶。反应在 94℃循环 1 分钟, 55℃循环 1 分钟, 72℃循环 1 分钟。30 次循环之后, 先用苯酚/氯仿(1/1) 提取反应物, 然后用氯仿提取, 并用乙醇沉淀。离心之后, 将 DNA 溶解在适当的限制缓冲液中, 并用 ApaI 和 KpnI 消化。从琼脂糖胶上分离最终的片段, 并将其连接在 pMR14(图 5)中, 该载体已经预先用相同的酶消化过了。pMR14 包含人  $\gamma 4$  重链不变区。当用 ApaI 和 KpnI 使 pMR14 裂开时, 该裂开的载体可接收消化的 DNA, 这样所消化 DNA 的 3'端在读框中与编码  $\gamma 4$  不变区序列的 5'端相连接。因此, 从此载体表达的重链是  $\gamma 4$  的同型。该连接混合物用于转化大肠杆菌菌株 LM1035, 并通过限制消化和核苷酸序列分析筛选最终的细菌群体。在此方法中, 鉴定了含 gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) (图 11) 正确序列的质粒。

#### 移植了 CDR 的修饰 Fab 片段的生产

使用大肠杆菌载体 pTTO-1 构造基于抗体 hTNF40 的, 移植了 CDR 的修饰 Fab 片段。将抗体 hTNF40 的可变区亚-克隆此载体, 优化基因间的序列以制造 pTTO (CDP870)。该 pTTO 表达载体引起可溶的, 重组蛋白在大肠杆菌中的胞质积累。此质粒的主要特征是:

- (i) 四环素抗性标记-没有被抗性基因产物灭活的抗生素, 因此保持了对含质粒细胞的选择;
- (ii) 低拷贝数-来源于质粒 p15A 的复制源, 其适合含 colE1 的质粒, 其中 colE1 得自复制子;
- (iii) 用于转录克隆基因的较强的, 诱导 tac 启动子;
- (iv) lacI<sup>q</sup> 基因-提供 lac 阻遏蛋白的基本表达, 保持阻抑状态中的 tac 启动子, 直到用 IPTG/异乳糖诱导;
- (v) OmpA 信号序列-提供克隆基因的胞质分泌; 和
- (vi) OmpA 信号序列至短 lacZ 肽的翻译偶联, 可有效的引发翻译。

该载体用于从双顺反子信息表达修饰的 Fab 片段, 以根据经验从一系列目标-建立的弹夹选择最佳的基因间序列。还描述了其在构造 pTTO (CDP870) 中的应用。

## 材料和方法

### DNA 技术

用于此方案的标准方法包括 DNA 限制，琼脂糖胶电泳，连接和转化。限制酶和 DNA 修饰酶是从 New England Biolabs 或 Boehringer Mannheim 得到的，并根据供应商的建议使用。使用 GeneClean 方案(BIO 101) 从琼脂糖纯化 DNA 片段。寡核苷酸是由 Oswel Oligonucleotide Service 提供的，并在 40nm 的等级合成。使用 Qiagen 的质粒 DNA Mini/Midi 试剂盒分离质粒 DNA。使用推荐的 Perkin Elmer 'Amplitaq' 进行 PCR。使用应用生物系统 Taq 循环测序试剂盒进行 DNA 测序。

### 摇瓶诱导

大肠杆菌 W3110 培养物是在添加了四环素 (7.5 $\mu$ g/ml) 的 L-肉汤中生长的。为了进行诱导，在 2L 带挡板摇瓶的 200mL 的 L-肉汤中，将新鲜的隔夜培养物 (在 30 $^{\circ}$ C 生长) 稀释成 0.1 的 OD<sub>600</sub>，并在 30 $^{\circ}$ C 的轨道培养箱中生长。加入 200 $\mu$ M，0.5 的 OD<sub>600</sub> 的 IPTG。间隔采集样品 (相对于 OD 标准化的)。

### 胞质提取物

在冰上冷冻培养样品 (5 分钟)，然后通过离心采集细胞。在提取缓冲液 (100mM Tris.HCl, 10mM EDTA, pH7.4) 中重混悬后，30 $^{\circ}$ C 过夜培养该样品，然后通过离心使其澄清。

### 装配试验

修饰 Fab 的浓度是通过 ELISA 测定的。用抗-人 Fd 6045 (2 $\mu$ g/ml) 的包被缓冲液，生理盐水，每个孔 100 $\mu$ l) 4 $^{\circ}$ C 过夜覆盖平板。清洗后，每个孔装入 100 $\mu$ l 的样品；将最初为 2 $\mu$ g/ml 的纯化 A5B7  $\gamma$ -1 Fab' 用作标准样品。越过平板在样品共轭缓冲液 (每升：6.05g 三氨基甲烷；2.92g NaCl；0.1ml Tween-20；1ml 酪蛋白 (0.2%)) 中连续稀释 2-倍；室温下搅拌培养平板 1 小时。清洗并干燥平板，然后加入 100 $\mu$ l 的抗-人 C- $\kappa$  (GD12) -过氧化物酶 (在样品共轭缓冲液中稀释)。

室温下搅拌培养 1 小时。清洗并干燥平板，然后加入 100  $\mu$ l 的底物溶液 (10ml 醋酸钠/柠檬酸钠溶液 (0.1M pH6)); 100  $\mu$ l 的  $H_2O_2$  溶液; 100  $\mu$ l 的四甲基联苯胺溶液 (10mg/ml 的二甲基 sulphoxide)。加入底物后，读 4-6 分钟 630nm 处的吸光度。

### 质粒 pTT0-1 的结构

#### (a) pTTQ9 多接头的置换

质粒 pTTQ9 是从 Amersham 获得的，并在图 14 中列出。用限制酶 SalI 和 EcoRI 消化等分试样 (2  $\mu$ g)，该消化是在 1%琼脂糖胶上进行的，纯化大的 DNA 片段 (4520bp)。当共同退火时，合成两个寡核苷酸，其编码图 15 所示的 OmpA 多接头区。此序列具有粘性末端，其与由 pTTQ9 限制所产生的 SalI 和 EcoRI 相一致。通过把此寡核苷酸“弹夹”克隆 pTTQ9 载体，SalI 位点没有再生，但保留了 EcoRI 位点。该弹夹编码在 OmpA 基因的 Shine Dalgarno 核糖体结合位点前加上的，大肠杆菌外-膜蛋白 Omp-A 的信号序列的前 13 个氨基酸。另外，存在 XbaI, MunI, StyI 和 SphI 酶的限制位点。MunI 和 StyI 位点位于 OmpA 信号序列的编码区内，并将作为基因插入的 5'克隆位点。组成此弹夹的两个寡核苷酸通过在 5pmoles/ $\mu$ l 的浓度混合，并在水浴中加热至 95 $^{\circ}$ C 3 分钟而共同退火，然后缓慢冷却至室温。将退火的序列连接到 SalI/EcoRI 半裂 pTTQ9 中。最终的质粒中间体，称作 pTQOmp，是通过 DNA 测序加以证实的。

#### (b) 片段的制备和连接

质粒 pTT0-1 是通过将来源于质粒 pACYC184 的一个 DNA 片段与来源于 pTQOmp 的两个片段连接而成的。质粒 pACYC184 从 New England Biolabs 得到，限制性酶切图在图 16 中给出。消化等分试样 (2  $\mu$ g) 以包括限制酶 StyI，然后用绿豆核酸酶处理；通过切掉后面的 5'碱基突出端而产生平端。苯酚提取和乙醇沉淀之后，用酶 PvuII 限制该 DNA，产生 2348, 1081, 412 和 403bp 的片段。2348bp 的片段是在进行琼脂糖胶电泳后纯化的。此片段编码四环素抗性标记和 p15A 的复制源。然后用小牛小肠碱性磷酸酶处理该片段，以除去 5'端的磷酸盐，

从而防止此分子的自身连接作用。

用酶 SspI 和 EcoRI 消化质粒 pTQ0mp 的等分试样 (2 μg), 进行琼脂糖胶电泳后, 从不需要的 2040bp 和 170bp 的片段纯化 2350bp 的片段; 此片段编码转录终止子区和 lacI<sup>q</sup> 基因。用 EcoRI 和 XmnI 消化 pTQ0mp 的另一个等分试样, 产生 2289, 1670, 350 和 250bp 的片段。凝胶纯化该编码 tac 启动子, OmpA 信号序列和多克隆位点的 350bp 的片段。

然后使用约等量的各片段连接上述三个片段, 以产生质粒 pTTO-1。所有的克隆连接均是通过 DNA 测序加以证实的。此质粒的限制性酶切图在图 17 中给出。然后通过插入编码人 Ig 轻链 κ 不变域的 DNA 而生产质粒 pTTO-2。其作为 SspI-EcoRI 的限制片段, 是从质粒 pHCl32 得到的, 并被插入到 pTTO-1 的相应位点中。质粒 pTTO-2 在图 18 中列出。

#### 将人源化的 hTNF40 可变区插入到 pTTO-2 中

可变轻链区 hTNF40gL1 (SEQ ID NO: 8) 是通过 PCR 从哺乳动物细胞表达 pMR10.1 的相应载体 ‘拯救’ 得到的。OmpA 的前导序列代替天然的 Ig 前导序列。PCR 引物的序列如下所示:

5'引物:

CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAG  
CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEQ ID NO:79)

3'引物:

TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEQ ID NO:80)

在标准条件下进行 PCR 后, 纯化产物, 用 MunI 和 SspI 酶消化, 然后进行凝胶纯化。将纯化的片段插入到 pTTO-2 的 MunI/SspI 位点中, 以产生轻链中间体 pTTO (hTNF40L)。

gh3hTNF40.4 的可变重链区是用相同的方法从载体 pγ-4 获得的。PCR 引物的序列如下所示:

5'引物:



GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG  
CTGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEQ ID NO:81)

3'引物:

GCCTGAGTTCCACGACAC (SEQ ID NO:82)

进行 PCR 后, 纯化产物, 用 *NheI* 和 *ApaI* 酶消化, 然后将其亚-克隆载体 pDNA<sub>Eng-G1</sub> (图 19)。通过 DNA 测序加以证实后, 用 *EcoRI* 酶限制重链, 并将其亚-克隆 pTTO (hTNF40L) 的 *EcoRI* 位点, 以生产大肠杆菌的表达质粒 pTTO (hTNF40)。

### 修饰 Fab 表达的基因间序列的优化

在 pTTO 载体中, 修饰的 Fab 表达是从先编码轻链然后编码重链的双顺反子信息发生的。两个基因 (基因间的序列, IGS) 间的 DNA 序列可通过影响转录的起始速率而影响重链的表达水平。例如, 短的基因间序列可导致轻链和重链间的转录偶联, 其中在完成轻链合成之后, 引发重链合成之前, 翻译核糖体不可能完全与 mRNA 分离。任一 Shine Dalgarno (SD) 核糖体结合位点 (与 16S rRNA 同源) 的 '强度' 还可影响 SD 和 ATG 起始密码子之间的距离和序列组成。ATG 周围的 mRNA 的潜在二级结构是另一个重要的因素; 当反向用于 SD 时, ATG 应位于 '环' 中, 而不应被限制在 '茎区' 中。因而通过改进 IGS 的长度和组成, 可修饰转录起始的长度, 和重链的生产水平。很可能需获得转录起始的最佳速率, 以使所提供修饰 Fab 重链的表达达到最大值。例如, 具有一个修饰的 Fab, 可容许高水平的表达, 但对于具有不同氨基酸序列的不同修饰 Fab 来说, 高水平的表达可能是有毒的, 这可能是由于不同的分泌或折叠效率。由于这个原因, 设计了一系列 4 个基因间序列 (图 20), 可根据经验确定基于 hTNF40 的修饰的 Fab 的最佳 IGS。IGS1 和 IGS2 具有非常短的基因间序列 (分别 -1 和 +1), 可提供紧密偶联的翻译; SD 序列 (下面划线的部分) 稍有不同。这两个序列最可能提供高水平的转录起始。IGS3 和 IGS4 在起始和终止密码子 (+13) 之间具有较长的距离, 且与它们的组成不同; IGS3 具有 '较强' 的 SD 序列。研究所有序列的二级结构 (使用 m/fold 程序) 并尽可能地使其优化; 然而, 随着两个链翻译的紧密偶联, 核糖体解离的

缺少意味着 mRNA 可以不是裸露的，防止二级结构形成。

### IGS 变体的克隆

图 20 所示的 IGS 弹夹具有侧面 SacI 和 MunI 克隆位点。它们是通过退火互补的寡核苷酸对而建立的。载体片段是通过用 SacI 和 NotI 消化 pTT0 (hTNF40) 而制备的，重链片段是通过用 MunI 和 NotI 消化 pDNAbEngG1 (hTNF40H) 而制备的。然后使用两个等量的限制片段，和各约 0.05pmoles 的退火寡弹夹进行三交连。其产生四个表达质粒 pTT0 (hTNF40 IGS-1), pTT0 (hTNF40 IGS-2), pTT0 (hTNF40 IGS-3), pTT0 (hTNF40 IGS-4)。

### 摇瓶表达分析

将上述四个质粒转化大肠杆菌菌株 W3110，和原始的表达构造，然后分析摇瓶中的表达。代表性试验的结果在图 21 中列出。不同的基因间序列提供不同的表达分布。在诱导后 1 小时，IGS1 和 IGS2 迅速积累胞质的修饰 Fab 至最大值，之后水平又降低。IGS1 的最大值更大，并更急剧地降低。如所期望的这些结构的紧密翻译偶联，这些结果与高水平的合成一致。IGS1 较之 IGS2 明显提供较高水平的重链表达。在这个实施例中，在 1 小时的峰值之后，因为胞质表达水平降低，所容许的高水平表达较差。这可在 IGS1 培养物（未标出）的生长分布中见到，下降之前，其在诱导后 1 小时达到峰值，表明细胞死亡并溶解。在水平降低之前，IGS3 更缓慢地累积修饰 Fab，其在诱导后 2 小时达到峰值，但峰值更高 (325ng/ml/OD)。此培养物的生长在诱导后又继续了 3 个小时，并达到更高的峰值生物量（未标出）。其与低水平的重链合成相一致。IGS4 仍然以较低的速率积累材料，但与其他三个结构相比，其不能达到其它 3 个结构的峰值产率。所有 IGS 变体均显著 out-完成原始载体。有关不同的 IGS 序列提供不同的翻译初始速率的假设是通过这些试验结果支持的。对于 hTNF40-修饰的 Fab 来说，似乎高速率的重链翻译初始耐受较差，因此其不是最佳的。IGS3 提供的较低速率产生较好的生长特性，和超时的较好的产率累积。

对比发酵罐中的产率，IGS3 结构的产率最高，并将其称为 pTT0 (CDP870)-见图 22。

由质粒 pTTO (CDP870) 编码的重链具有 SEQ ID NO:115 所列的序列，轻链具有 SEQ ID NO:113 所列的序列。

移植了 CDR 的，hTNF40 基-修饰 Fab 的 PEG 化作用

纯化的修饰 Fab 与支链的 PEG 分子位点-特异性缀合。其可以通过活化修饰 Fab 的截短铰链区中的单一半胱氨酸残基，接着按照上述 (A. P. Chapman 等, nature Biotechnology 17, 780-783, 1999) 与 (PEG)-赖氨酰马来酰亚胺反应而获得。该 PEG 化的分子在图 13 中列出，并将其称为化合物 CDP870。

PEG 化的移植了 CDR 的，hTNF40 基修饰 Fab (CDP870) 在治疗类风湿性关节炎中的功效。

CDP870 具有约 11 天的较长半衰期。

我们评估了静脉内 CDP870 在患 RA 患者的随机，双盲，安慰剂-对照，给药逐渐升高试验中的安全性和功效。

## 方法

### 患者:

患者的年龄在 18-75 岁之间，满足 1987 年修订的类风湿性关节炎 (RA) 的 American College of Rheumatology (ACR) 诊断标准，上述患者是从位于伦敦，剑桥，诺福克和 Norwich (英国) 的风湿病诊所的门诊病人中招募的。要求患者具有由至少 3 个下列标准定义的临床活性疾病： $\geq 6$  个疼痛或触痛的关节； $\geq 45$  分钟的早晨的强直；及血沉速率 (ESR)  $\geq 28$  mm/hr。它们必须至少对一种疾病改善抗-类风湿药物 (DRARD) 没有良好的反应，且至少已经 4 周没有治疗。如果泼尼松龙的给药剂量  $\geq 7.5$  mg/day，则可以给皮质类固醇。怀孕的妇女，哺乳的妇女和未使用有效的避孕方法，可能分娩的妇女被排除在外。具有恶性肿瘤既往史，伴发严重的不可控制的内科病症，TNF  $\alpha$ -中和治疗失败的既往史，或对聚乙二醇过敏的患者被排除在外。书面提供的同意书是在登记之前从各患者处得到的。该研究由地方研究伦理委员会证实。

### 治疗方案:

将 36 名 RA 患者分成 3 组, 每位患者均接受给药剂量逐渐增加的试验药物 (1, 5 或 20mg/kg)。把每组的 12 个人随机的分成 8 个人接受 CDP870, 4 个人接受安慰剂。静脉内单独输注 CDP870 (总量 100ml) 超过 60 分钟。类似地, 将 100ml 安慰剂 (醋酸钠缓冲液) 静脉内单独输注超过 60 分钟。在门诊病人的基础上提供治疗。8 周之后, 所有的患者均有机会开放地接受 5 或 20mg/kg 的 CDP870 的输注。

### 临床评估:

根据世界卫生组织和 International League of Associations for Rheumatology (Boers 等, *J. Rheumatol-Supplement*, 41, 86-89, 1994) 和 European League Against Rheumatism (EULAR) (Scott 等, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 10, 521-525, 1992) 用 28 个关节计数组合的核心数据评估 RA 的疾病活动性。通过疾病活动性值 (Prevo 等, *Arthritis Rheum.*, 38, 44-48, 1995) 和 ACR 反应标准 (Felson 等, *Arthritis Rheum.*, 38, 727-735, 1995) 评估疾病活动性的变化。在治疗前和治疗后的第 1, 2, 4, 6 和 8 周进行评估。而且还评估患者对所研究药物的耐受性和安全性。并且评估了 Haematology, 生物化学, 抗-CDP870 抗体和不利事件。

### CDP870 的血浆浓度和抗-CDP870 的抗体:

CDP870 是通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测量的。在用重组人 TNF  $\alpha$  (Strathmann Biotech GmbH, Hannover) 包被的微量滴定平板 (Nunc) 中培养患者血浆的连续稀释液。用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-人  $\kappa$  轻链 (Cappel, ICN), 和四甲基联苯胺 (TMB) 底物显示捕获的 CDP870。

使用生物素化的 CDP870 作为第二层的双抗原夹层 ELISA 筛选 CDP870 的抗体 (1/10 的血浆稀释度)。使用 HRP-链霉抗生物素和 TMB 底物显示束缚抗体。使用超免疫兔 IgG 标准校准该测定法。1 个单位的活动性等于 1  $\mu$ g 兔的标准。

### 统计分析

该研究实质上是探索性的, 样品的多少是根据先前相似药剂的经

验而确定的。CDP870的功效可通过计算疾病活动性值(DAS)和ACR20/50来分析,其使用闭合的试验方法治疗。疾病的活动性值是按照下列公式计算的:  $DAS=0.555x(28\text{个触痛关节})\text{的平方根}+0.284x(28\text{个肿胀关节})\text{的平方根}+0.7x\ln(\text{ESR})+0.0142x(\text{患者的综合评估})$ 。首先,将活性组与安慰剂组进行对比。如果此对比在5%水平是显著的,则将各给药组与安慰剂组对比。所有的对比是双尾的具有5%显著水平的。所有的P值均来源于探索性的分析,且不应用于推论解释。

## 结果

### 统计学

征募36个患RA的患者。它们的统计数据在表6中给出。平均年龄56岁,30名患者为女性。患RA的平均时间为13年,21名患者的类风湿因子显阳性。不同组的患者具有相似的统计特性。在盲给药时,6/12用安慰剂治疗的患者因为给药后 $RA \geq 4$ ,疾病恶化而退出本研究。2/24用CDP870治疗的患者退出,均为1mg/kg组的,其在给药之后 $>4$ 周,RA恶化。其差值在统计学上是显著的( $p=0.009$ , Fisher精确试验)。

表6: 统计数据(平均值±标准偏差)

	数	性别 (M:F)	年龄	疾病的 持续时间	类风湿因子 以前DMARD 的数
安慰剂	12	1:11	51±8	12±8	8(67%)
1 mg/kg	8	1:7	59±7	12±7	4(50%)
5mg/kg	8	2:6	54±13	13±5	5(63%)
20 mg/kg	8	2:6	61±11	14±13	4(50%)

### 临床功效:

在给安慰剂,1,5和20mg/kg的CDP870(联合治疗效果 $p=0.012$ )之后第4周,ACR20提高的患者的比例分别为16.7,50,87.5和62.5%,给药后第8周的比例分别为16.7,25,75和75%( $p=0.032$ )。在给安

安慰剂, 1, 5 和 20mg/kg 的 CDP870 (联合治疗效果  $p=0.001$ ) 之后第 4 周, DAS 值 (中值) 降低的比例分别为 0.15, 1.14, 1.91 和 1.95%, 给药后第 8 周的比例分别为 0.31, 0.09, 2.09 和 1.76% ( $p=0.008$ ) (图 23)。世界卫生组织和 International League of Associations for Rheumatology 各成员核心数据值的改变在图 24 中列出。

给予 CDP870 的开放标记剂量后, 可获得相似的有益效果。上述 36 个该研究招募的患者, 其中的 32 个患者接受 CDP870 的第二次输注。第一次输注 5 和 20mg/kg CDP 后第 4 周, ACR20 提高的患者的比例为 72.2 和 55.6%, 在第 8 周后为 55.6 和 66.7%。

### 不利的结果

该治疗可较好地耐受, 且没有与输注相关的反应产生。没有关于变态反应或皮疹的报道。在双-盲阶段, 在安慰剂, 1, 5 和 20mg/kg 组中分别有 19, 38, 8 和 14 个不利事件。最普遍的是 5 个患者中有 9 次头痛发作 (安慰剂组 1 个, 1mg/kg 组 3 个, 20mg/kg 组 1 个)。一个接受安慰剂的患者和三个接受 CDP870 的患者 (1 个为 5mg/kg, 2 个为 20mg/kg) 有较弱的呼吸道感染。据报道这些为轻度或中度。他们是用口服抗生素治疗的, 且症状在 1-2 周后消退。1 和 5mg/kg 组的三个患者和 20mg/kg 组的一个患者在用 CDP870 治疗之后 1-2 个月出现泌尿道感染。还有一个严重的不利事件是患者在用 1mg/kg 的剂量输注 3 天后, 出现颈部疼痛。在 4 个患者中可见到抗-核抗体的增加: 安慰剂组 1 个 (低 1/40), 1mg/kg 组 2 个 (低 1/40, 低 1/80), 20mg/kg 组 1 个 (低 1/40)。抗-DNA 或抗-心脂质抗体没有变化。

### CDP870 的血浆浓度和抗-CDP870 的水平

对于 CDP870 的所有给药水平来说, 峰值血浆浓度出现在输注结束的时候, 且血浆浓度水平随着给药的比例而缓慢降低。CDP870 的血浆浓度与先前在志愿者中观察到的非常相似, 所计算的半衰期约为 14 天。再-给药时, 观察到单一给药输注的相似分布。

单独静脉内输注后, 抗-CDP870 水平较低或检测不到。

### 讨论

中和 TNF $\alpha$ 对于 RA 来说是一种有效的治疗策略。目前,这种治疗还需要使用生物制剂,如嵌合 mAb 或可溶性受体/人 Fc 融合蛋白,但其成本较高。治疗性的 TNF $\alpha$ 中和剂需要结合具有高亲和力的 TNF $\alpha$ ,且其具有较长的血浆半衰期,低抗原性和高耐受性及安全性。且它需要接近所有从阻断 TNF $\alpha$ 受益的 RA 患者。可达到这些目的的一个技术是与大肠杆菌中产生的 TNF $\alpha$ 结合抗体片段的聚乙二醇相缀合。在初步研究中,我们发现 CDP870, PEG 化的,抗-TNF $\alpha$ , 修饰的 Fab, 是有效的,且 RA 患者可很好地耐受。

体外研究证实 CDP870 具有与鼠科动物抗-TNF $\alpha$ 亲代抗体相似的 TNF $\alpha$ 中和活性。此研究证实 CDP870 可减轻炎症,并改善 RA 的症状。将通过 ACR20 反应标准所测量的 5 和 20mg/kg 组 (75%, 75%) 对临床的改善作用与 etanercept (60%) (Moreland 等, *Annals Int. Med.*, 130, 478-486, 1999) 和 infliximab (50%) (Maini 等, *Lancet*, 354, 1932-1939, 1999) 相对照。在中间和最高给药水平进行试验,与前面其它的 mAbs (Elliott 等, *Lancet*, 344, 1105-1110, 1994 和 Rankin 等, *Br. J. Rheumatol.*, 34, 334-342, 1995) 相比,其治疗效果可持续 8 周。先前的研究已经证实抗-TNF $\alpha$ 抗体的治疗效果与它的血浆半衰期和循环抗体的产生有关 (Maini 等, *Arthritis Rheum*, 38, (增刊): S186 1995(摘要))。我们的研究则显示 CDP870 的血浆半衰期为 14 天,与全抗体的血浆半衰期相等 (Rankin 等, (*supra*)), 比未缀合的 Fab 片段的半衰期要长得多。此外, CDP870 所产生抗体反应的水平非常低。

本研究的其中一个重要目的是为了检测给予此 PEG 化 Fab 的耐受性和安全性。在我们的研究中, CDP870 显示了良好的耐受性。虽然进一步的研究还需要评估其长期毒性,但现有技术已经报道过了与 etanercept 和 infliximab 有关的脱髓鞘性疾病,感染和皮疹。

总之, CDP870 可有效的治疗 RA, 且其在此短期研究中可很好地耐受。

应当理解, 上述实施例仅仅是举例说明, 不能用来限制本发明的范围, 本发明的范围在下列权利要求中限定。

## 序列表

<110> CELLTECH CHIROSCIENCE LIMITED

<120> 生物制品

<130> P021741GB

<140>

<141>

<160> 115

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 CDRH1 的描述

<400> 1

Asp Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40/人类杂交 CDRH2 的描述

<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> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列:hTNF40 CDRH3 的描述

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

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列:hTNF40 CDRL1 的描述

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

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列:hTNF40 CDRL2 的描述

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

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 CDRL3 的描述

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 CDRH2 的描述

<400> 7

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Val Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<220>

<223> 人工序列:hTNF40-gL1 的描述

<400> 8

gac att caa atg acc cag agc cca 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
      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> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<220>

<223> 人工序列:hTNF40-gL2 的描述

<400> 9

```

gac att caa atg acc cag agc cca 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 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> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<220>

<223> 人工序列:gh1hTNF40.4 的描述(图 10)

<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 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      1                5                10                15

tcc gtc aaa gtt tcg 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> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<220>

<223> 人工序列:gh3hTNF40.4 的描述(图 11)

<400> 11

```

gag gtt cag ctg gtc gag tca gga ggc ggt ctc gtg cag cct ggc gga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      1              5              10              15

tca ctg aga ttg tcc tgt gct gca tct ggt tac gtc ttc aca gac tat 96

```

---

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

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 gct 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 gca tac 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

ctc caa atg 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

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> 12  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列:部分引物序列的描述

<400> 12  
gccgccacc

9

<210> 13  
<211> 26  
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH1 的描述

<400> 13

atgaaatgca gctgggtcat sttctt

26

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH2 的描述

<400> 14

atgggatgga gctratcat sytctt

26

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH3 的描述

<400> 15

atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt

26

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH4 的描述

<400> 16

atgractttg ggytcagctt grt

23

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH5 的描述

<400> 17

atggactcca ggctcaattt agtttt

26

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH6 的描述

<400> 18

atggctgtcy trgsgctret cttctg

26

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH7 的描述

<400> 19

atggratgga gckggrtctt tmtctt

25

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:引物 CH8 的描述



<400> 20	
atgagagtgc tgattctttt gtg	23
<210> 21	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列: 引物 CH9 的描述	
<400> 21	
atggmttggg tgtggamctt gctatt	26
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列: 引物 CH10 的描述	
<400> 22	
atgggcagac ttacattctc attcct	26
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列: 引物 CH11 的描述	
<400> 23	
atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
<210> 24	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 人工序列：引物 CH12 的描述

<400> 24

atgatggtgt.taagtcttct gtacct

26

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 5'端

<400> 25

gcgcgcaagc ttgccgccac c

21

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL1 的描述

<400> 26

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct

29

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL2 的描述

<400> 27

atggagwcag acacactcct gytatgggt

29

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL3 的描述

<400> 28

atgagtgtgc tcaactcaggt cct

23

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL4 的描述

<400> 29

atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg

26

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL5 的描述

<400> 30

atggatttwc aggtgcagat twtcagctt

29

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL5A 的描述

<400> 31

atggatttwc argtgcagat twtcagctt

29

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL6 的描述

<400> 32

atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg

26

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL7 的描述

<400> 33

atgggcwtca agatggagtc aca

23

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL8 的描述

<400> 34

atgtggggay ctktttycmm tttttcaat

29

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL9 的描述

<400> 35

atggtrtcw casctcagtt cett

24

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL10 的描述

<400> 36

atgtatatat gtttgttgtc tatttc

26

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL11 的描述

<400> 37

atggaagccc cagctcagct tctctt

26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL12A 的描述

<400> 38

atgragtywc agaccaggt cttyr

26

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL12B 的描述

<400> 39

atggagacac attctcaggt ctttgt

26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL13 的描述

<400> 40

atggattcac aggccccaggt tcttat

26

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL14 的描述

<400> 41

atgatgagtc ctgcccagtt cctggt

26

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL15 的描述

<400> 42

atgaatttgc ctgttcacat cttggtgct

29

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL16 的描述

<400> 43

atggattttc aattggctct catctcctt

29

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL17A 的描述

<400> 44

atgaggtgcc tarctsagtt cctgrg

26

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL17B 的描述

<400> 45

atgaagtact ctgctcagtt tctagg

26

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL17C 的描述

<400> 46

atgaggcatt ctcttcaatt cttggg

26

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 5' 端

<400> 47

ggactgtteg aagccgccac c

21

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 CL12 的描述

<400> 48

ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt

30

<210> 49

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 R2155 的描述

<400> 49

gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrqag acdgtga

37

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 R1053 的描述

<400> 50

gctgacagac taacagactg ttcc

24

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 R720 的描述

<400> 51

gctctcggag gtgctcct

18

<210> 52

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7982 的描述

<400> 52

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg 60  
tattcagcaaa 70

<210> 53

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7983 的描述

<400> 53

atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctgggt tttgctgata 60  
ccaggctacg t 71

<210> 54

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7984 的描述

<400> 54

tacagtgcct ctttcctcta tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggt 60  
actgatttca c 71

<210> 55

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7985 的描述

<400> 55

gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60  
taccactacc g 71

<210> 56

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7986 的描述

<400> 56

atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggtta 60

ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7981 的描述

<400> 57

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 P7980 的描述

<400> 58

gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 R1053 的描述

<400> 59

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 R5350 的描述

<400> 60

tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 R5349 的描述

<400> 61

gcagatgggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：寡核苷酸 R684 的描述

<400> 62

ttcaactgct catcagat 18

<210> 63

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7989 的描述

<400> 63

gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60  
aattc 65

<210> 64

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7990 的描述

<400> 64

ggttaagaag cctgggtgctt ccgtcaaagt ttcgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60  
agactatggt a 71

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7991 的描述

<400> 65

ccaacccatc catttcaggc cttgtcccgg ggctgcttg acccaattca taccatagtc 60  
tgtgaacacg t 71

<210> 66

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7995 的描述

<400> 66

ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60  
ttcaagggca gattcacgtt c 81

<210> 67

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7992 的描述

<400> 67

ccatgtaatgc agtgcggtgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7993 的描述

<400> 68

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60  
at 62

<210> 69

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7994 的描述

<400> 69

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7988 的描述

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7987 的描述

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

<210> 72

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7999 的描述

<400> 72

gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60  
aattc 65

<210> 73

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P8000 的描述

<400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtcctgtgct gcatctggtt acgtcttcac 60  
agactatgga a 71

<210> 74

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P8001 的描述

<400> 74

ccaaccate catttcaggc cctttcccgg ggctgctta acccaattca ttccatagtc 60  
tgtgaagacg t 71

<210> 75

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7997 的描述

<400> 75

ggaggatgctggtgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7998 的描述

<400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60  
at 62

<210> 77

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7993 的描述

<400> 77

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：引物 P7996 的描述

<400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc

30

<210> 79

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 5'引物

<400> 79

cgcgcgga ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60  
atgacccaga gcc

74

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 3'引物

<400> 80

ttcaactgct catcagatgg

20

<210> 81

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 5'引物

<400> 81

gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttcgccaccg tggcgcaagc tgaggttcag 60  
ctggtcgagt caggaggc

78

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>



<223> 人工序列: 3'引物

<400> 82

gcctgagttc cagcac

18

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 人类1组共有序列的构架L1的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: hTNF40的构架L1的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：人类 1 组共有序列的构架 L2 的描述  
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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：hTNF40 的构架 L2 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：人类 1 组共有序列的构架 L3 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 的构架 L3 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 人类 1 组共有序列的构架 L4 的描述

<400> 89

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

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 的构架 L4 的描述

<400> 90

```
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
  1           5           10
```

<210> 91

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：人类1组共有序列的构架H1的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：hTNF40的构架H1的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列：人类1组共有序列的构架H2的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 的构架 H2 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列: 人类 1 组共有序列的构架 H3 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 的构架 H3 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:人类 1 组共有序列的构架 H4 的描述

<400> 97

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:hTNF40 的构架 H4 的描述

<400> 98

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 99

<211> 324

<212> DNA

<213> 鼠科动物

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> 小鼠 hTNF40 轻链的可变域

<400> 99

gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat 96

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20	25	30	
gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa gca ctg att			144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile			
35	40	45	
tac tcg gca tcc ttc cta tat agt gga gtc cct tat cgc ttc aca ggc			192
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Thr Gly			
50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc act gtg cag tct			240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Val Gln Ser			
65	70	75	80
gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac atc tat cct ctc			288
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu			
85	90	95	
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt			324
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
100	105		
<210> 100			
<211> 354			
<212> DNA			
<213> 鼠科动物			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(354)			
<223> 小鼠 hTNF40 重链的可变域			
<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> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (29)..(67)

<223> 人工序列:OmpA 寡核苷酸连接物的描述

<400> 101

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

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



<210> 102  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

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

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

<220>  
 <223> 人工序列:IGS 弹夹-1 的描述

<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> DNA  
 <213> 人工序列

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

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

<220>  
 <223> 人工序列:IGS 弹夹-2 的描述

<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> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

<220>

<223> 人工序列:IGS 弹夹-3 的描述

<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

ggaggaaaaaaa 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> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

<220>

<223> 人工序列:IGS 弹夹-4 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:人类 3 组共有序列的构架 H1 的描述

<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> 人工序列

<220>

<223> 人工序列:人类 3 组共有序列的构架 H2 的描述

<400> 107

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1

5

10

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列:人类3组共有序列的构架H3的描述

&lt;400&gt; 108

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1

5

10

15

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

20

25

30

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列:人类3组共有序列的构架H4的描述

&lt;400&gt; 109

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 648

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fab的移植重链

<400> 110  
 gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggc ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60  
 tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120  
 ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180  
 gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240  
 ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300  
 agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360  
 accaagggcc catcggctct cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420  
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480  
 tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540  
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacac 600  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggctcgaca agaaagt 648

<210> 111  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Fab 的移植重链

<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
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
	165	170
		175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
	180	185
		190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
	195	200
		205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
	210	215

<210> 112

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab 的移植轻链和修饰的 Fab

<400> 112

```

gacattcaaa tgaccagag cccatccagc ctgagcgcat ctgtaggaga cgggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggt actaacgtag cctggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaagccct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
aggttcagcg gatccggtag tggactgat ttcaccctca cgatcagtag cctccagcca 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccactcac attcggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta ggggccccat ctgtcttcat ctcccccca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642

```

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab的移植轻链和修饰的 Fab

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                  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> 687

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰 Fab 的移植重链

<400> 114

```

gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggc ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60
tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180
gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catcggctct cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 687

```

<210> 115

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰 Fab 的移植重链

<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

## 抗体hTNF40轻链的构架区与人类1组共有序列的对比

人类1组共有序列	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 83)
hTNF40	:	DIYMTQSO <u>KFMST</u> SVGDRVSVTC (SEQ ID NO: 84)
人类1组共有序列	:	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)
hTNF40	:	WYQQKPGQSPKALIIY (SEQ ID NO: 86)
人类1组共有序列	:	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)
hTNF40	:	GV <u>PYRFT</u> GSGSGTDFTLTI <u>STVQ</u> SEDLAEYFC (SEQ ID NO: 88)
人类1组共有序列	:	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 89)
hTNF40	:	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 90)

## 图 1

## hTNF40的CDRs的序列

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2' WINTYIGEPYADSVKG (SEQ ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

## 图 3

## 抗体hTNF40重链的构架区与人类1组和3组共有序列的对比

人类1组共有序列 hTNF40	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 91)
	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT</u> (SEQ ID NO: 92)
人类1组共有序列 hTNF40	: WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 93)
	: <u>WVKQAPGKAFKWMG</u> (SEQ ID NO: 94)
人类1组共有序列 hTNF40	: RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 95)
	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINNLKNETATYFCAR</u> (SEQ ID NO: 96)
人类1组共有序列 hTNF40	: WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 97)
	: <u>WGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 98)
人类3组共有序列 hTNF40	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 106)
	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT</u> (SEQ ID NO: 92)
人类3组共有序列 hTNF40	: WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 107)
	: <u>WVKQAPGKAFKWMG</u> (SEQ ID NO: 94)
人类3组共有序列 hTNF40	: RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 108)
	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINNLKNETATYFCAR</u> (SEQ ID NO: 96)
人类3组共有序列 hTNF40	: WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 109)
	: <u>WGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 98)

图 2

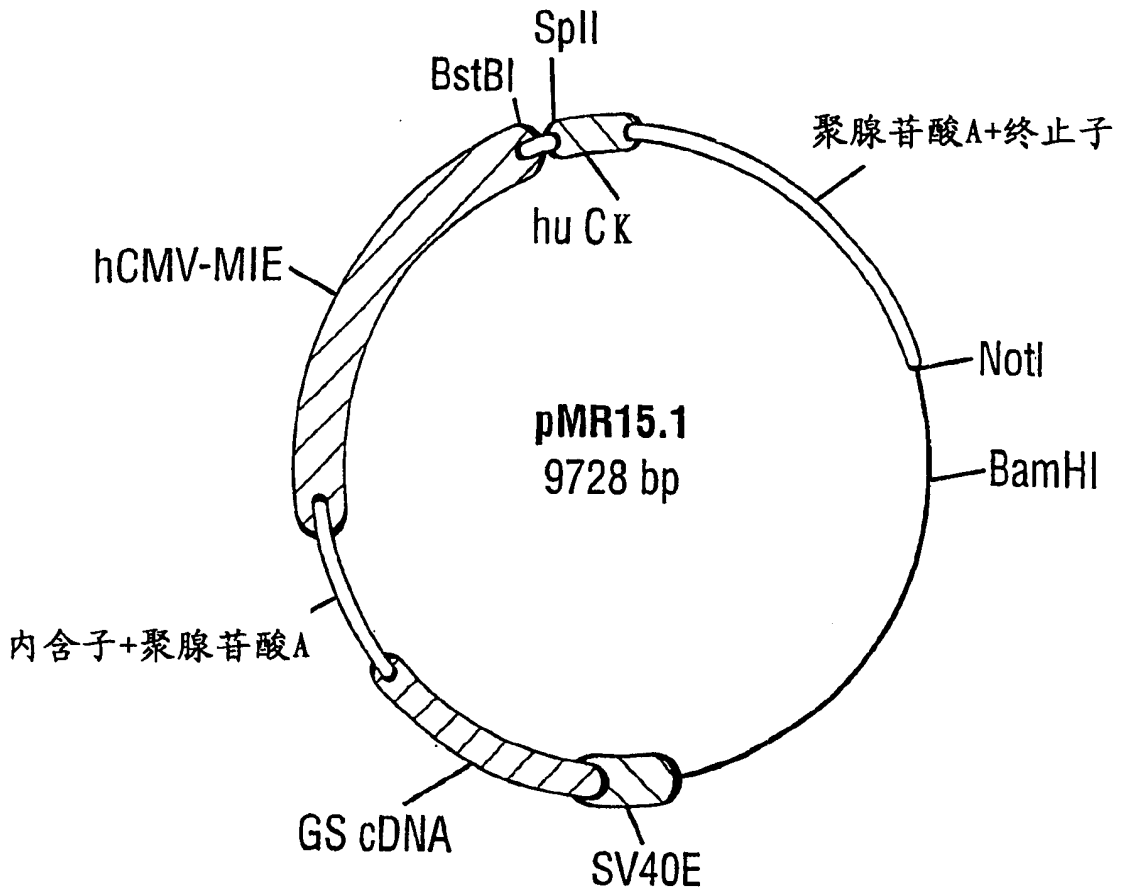


图 4

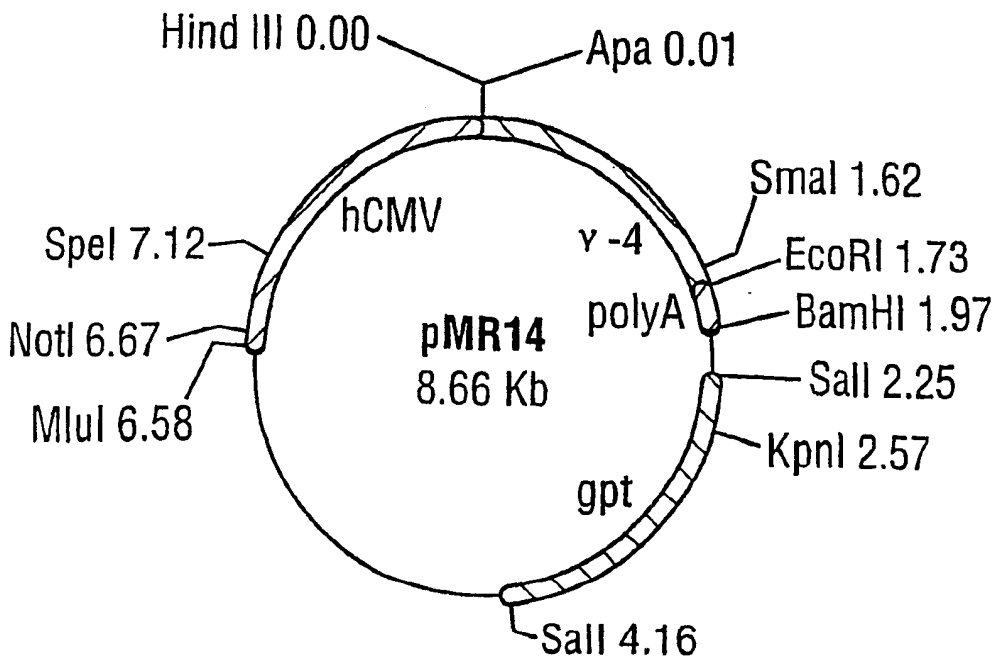


图 5

## 鼠科动物hTNF40的VI序列 (SEQ ID NO:99)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG
CTG TAA CAC TAC TGG GTC AGA GTT TTT AAG TAC AGG TGT AGT CAT CCT CTG TCC
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 CGG TCA GTC TTA CAC CCA TGA TTA CAT CGG 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     160
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT CCA AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA
GTT GTC TTT GGT CCT GGT 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     270
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 GCT 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   I   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>

```

图 6

## 鼠科动物hTNF40的Vh序列 (SEQ ID NO:100)

```

10      20      30      40      50
CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GGA AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC
GTC TAG GTC AAC CAC GTC AGA CCT GGA CTC GAC TTC TTC GGA CCT CTC TGTT 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 TGG ATA AAC ACC TAC
CAC TTC GTC CGA GGT CCT TTC CGA AAG TTC ACC TAC CCG ACC TAT TTG TGG ATG
V   K   Q   A   P   G   K   A   F   K   W   M   G   W   I   N   T   Y>

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

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

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

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

```

 7

## hTNF40的移植VI序列 (SEQ ID NO: 8)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG 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 CGG 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>

```

## hTNF40的移植VI序列 (SEQ ID NO: 9)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC 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   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 CGG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

110     120     130     140     150     160
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA CTC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT GAG GAG TAG ATG TCA CCA CGG 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 CGG 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>

```

图 9



## hTNF40的移植Vh序列 (SEQ ID NO: 10)

```

10  CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GCT TCC GTC
    GTC CAC GTC GAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GSA CCA CGA AGG CAG
    Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V>

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

110 120 130 140 150 160
    GTC AGA CAG GCC CCG GGA CAA GGC CTG GAA 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 AAG
    V R Q A P G Q G L E W M G W I N T Y>

170 180 190 200 210
    ATT GGA GAG CCT ATT TAT GCT CAA AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACB TTC ACT CTA
    TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA GTT 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 GAC TCT AGG CTC CTG
    D T S T S T A Y M E L S S 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 CGS 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>

```

图 10

## hTNF40.4的移植Vh序列 (SEQ ID NO: 11)

```

10      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>
      20      30      40      50
60      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>
      70      80      90      100
110     120     130     140     150     160
      GTT AGA CAG GCC CCG GGA AAG GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
      CAA TCT GTC CGG 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 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 AGA ATA CGG TAC CTG ATG ACC
      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>

```

图 11

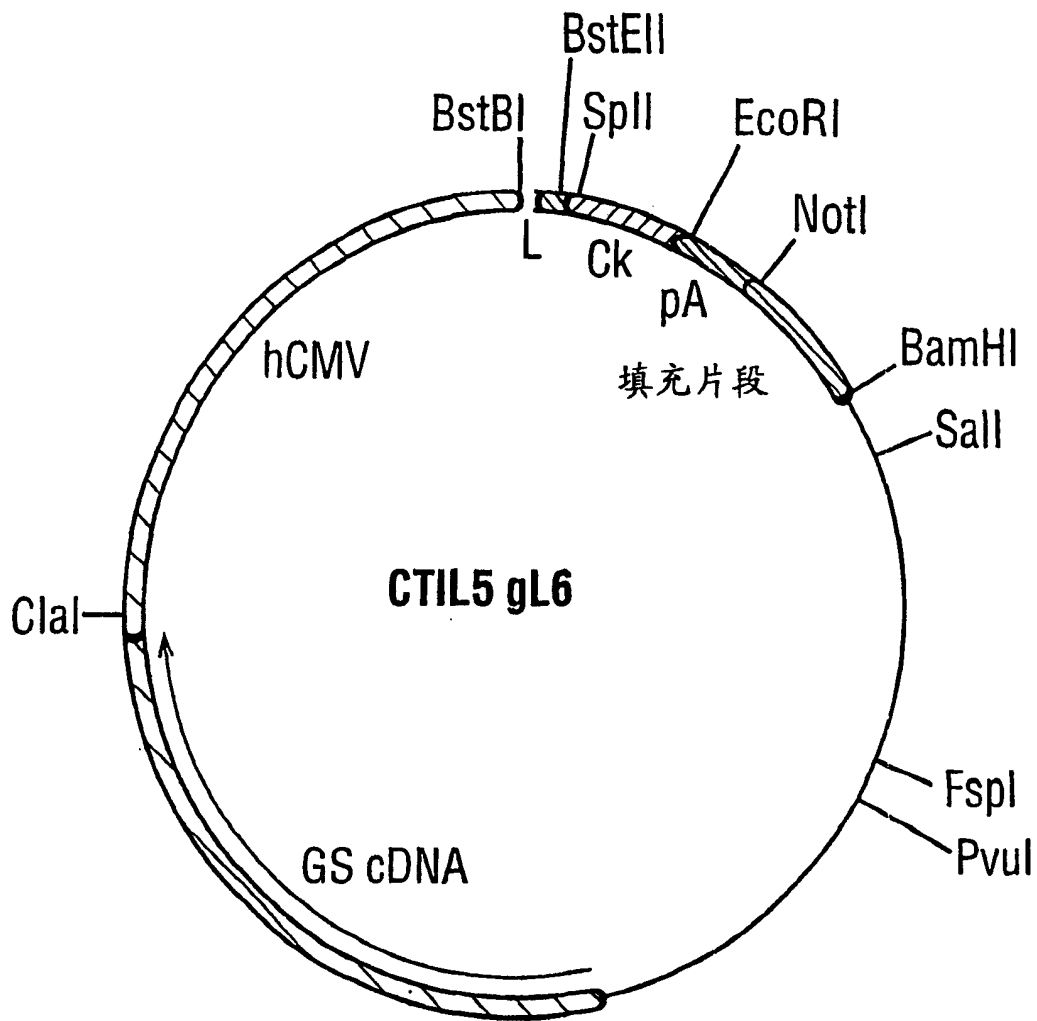


图 12

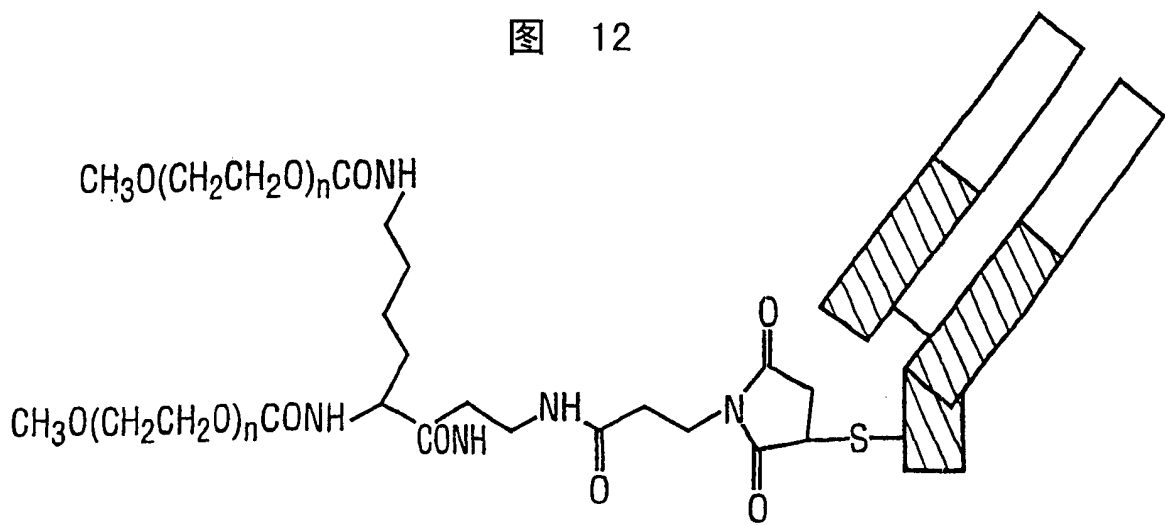


图 13

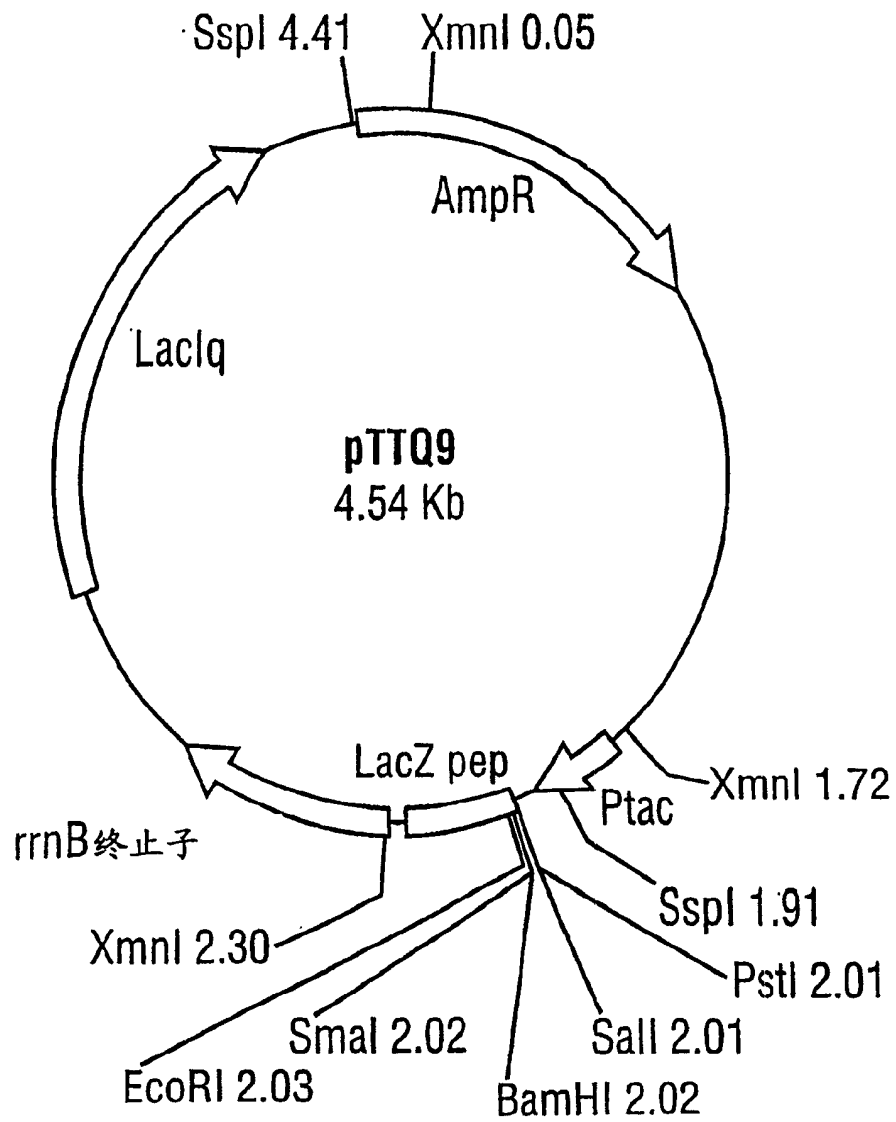


图 14

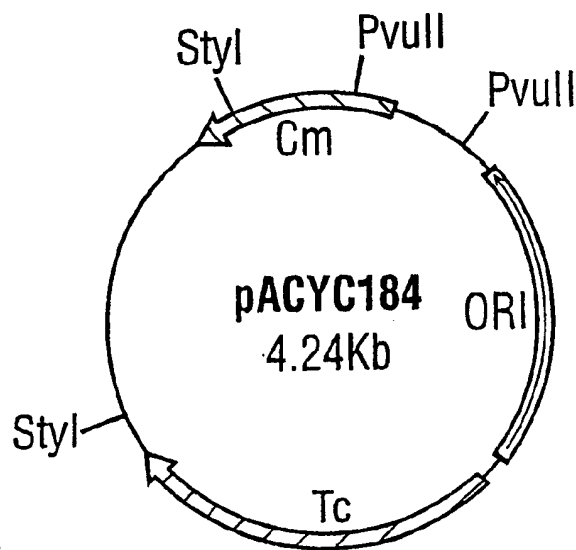
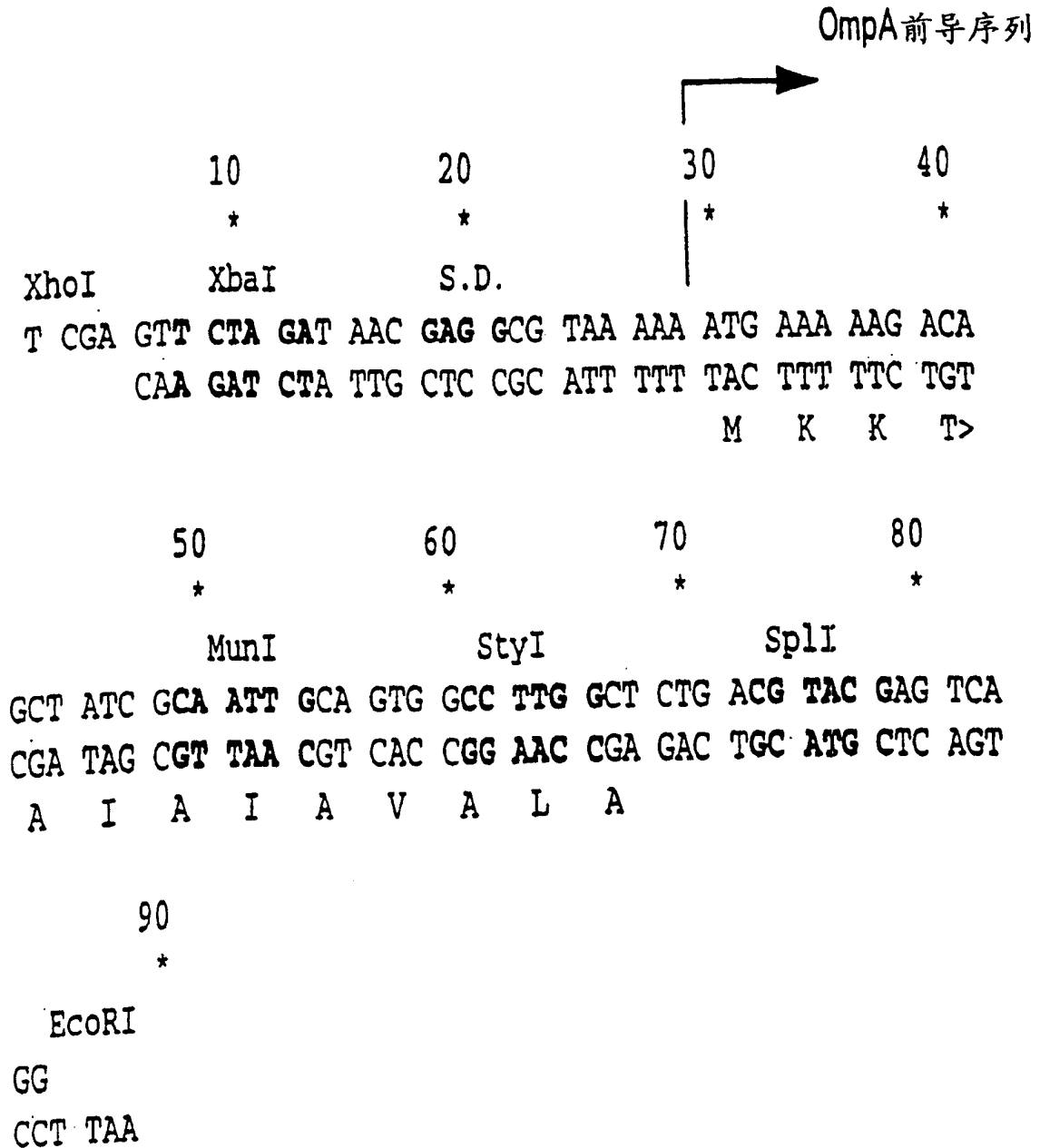


图 16

## OmpA寡核苷酸连接物的序列 (SEQ ID NO: 101)



- 内部限制位点用粗体字表示
- 5' XhoI粘末端连接到载体SalI位点, 阻断它
- S.D代表OmpA的Shine Dalgarno序列

图 15

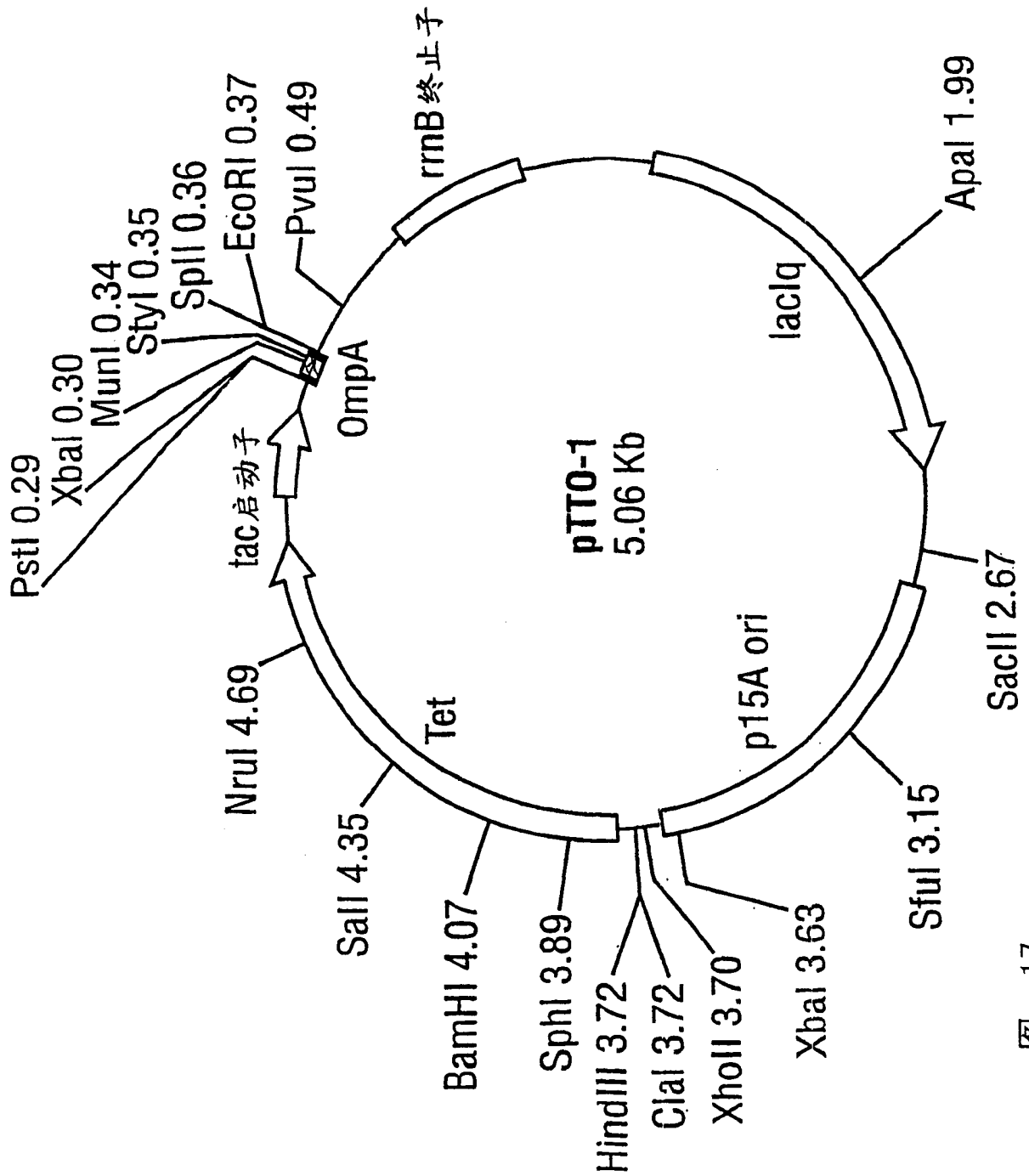


图 17

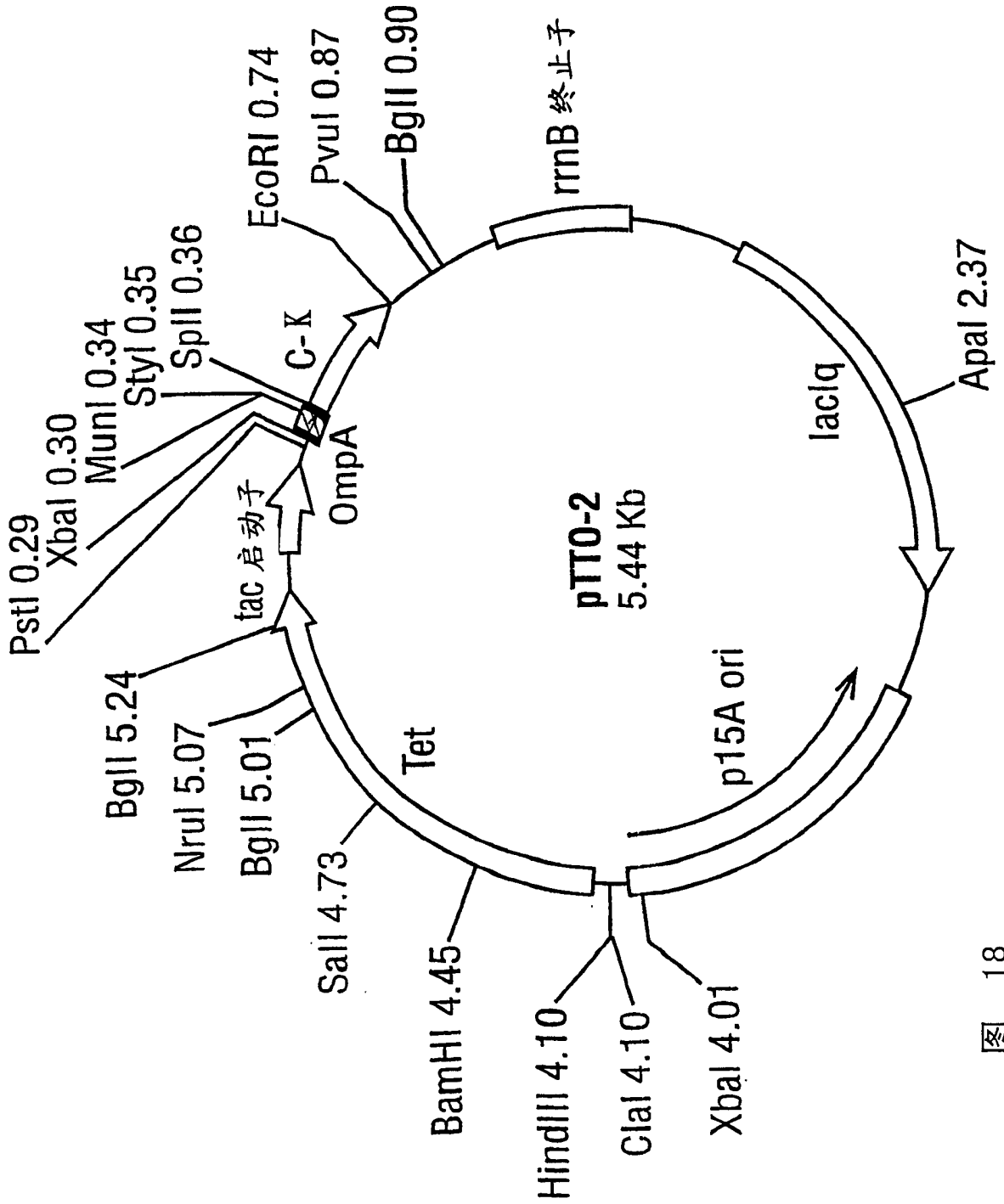


图 18

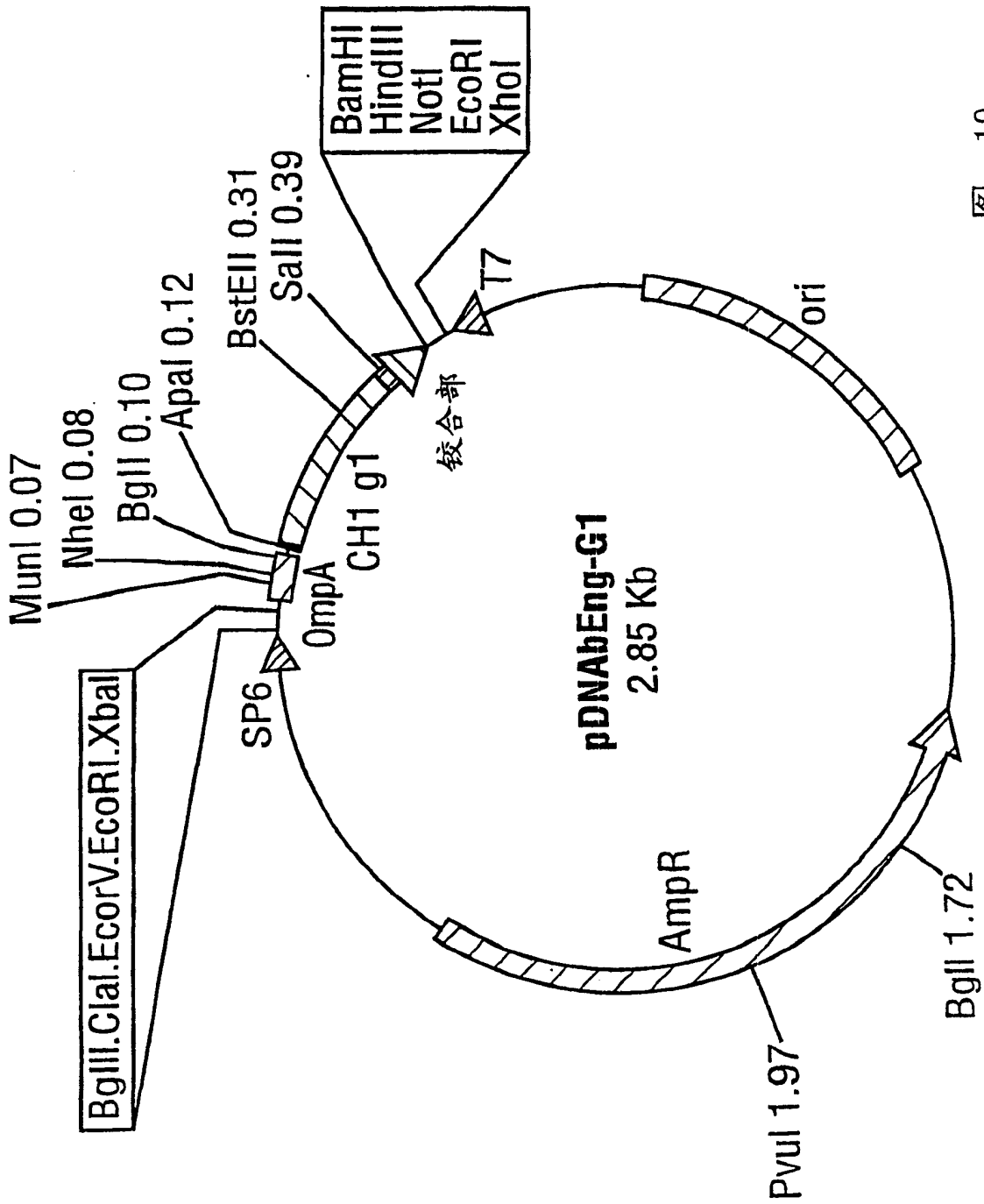


图 19



编码不同的大肠杆菌Fab表达的基因间序列的寡核苷酸弹头

IGS 弹头 -1; 基因间的间隙 = -1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TAAATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 102)

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

C-K序列的结束 ->

OmpA序列的开始 ->

IGS 弹头 -2; 基因间的间隙 = +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 (SEQ ID No: 103)

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

IGS 弹头 -3; 基因间的间隙 = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAAAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 104)

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

IGS 弹头 -4; 基因间的间隙 = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGAGGATTATATAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 105)

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

图 20

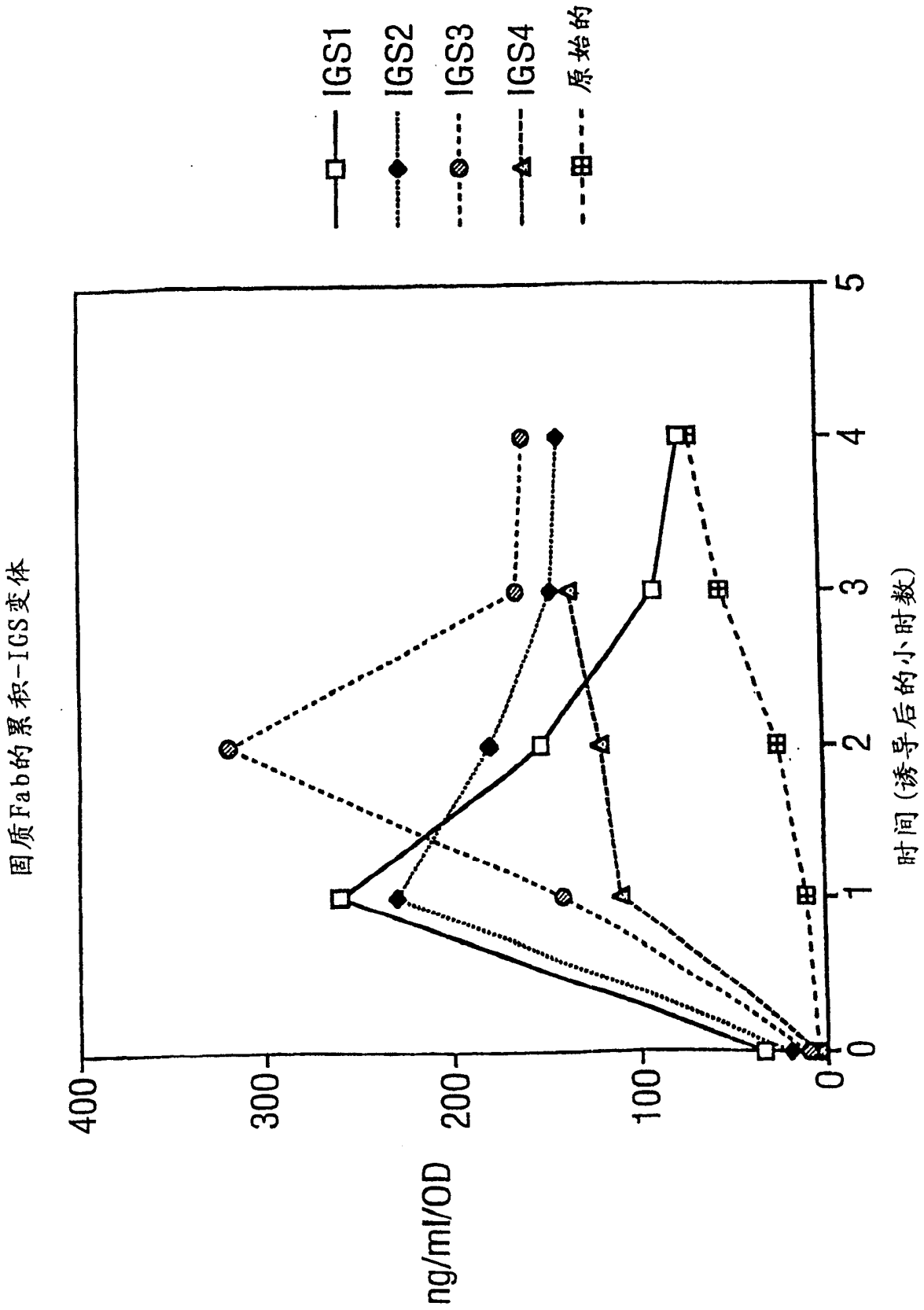


图 21

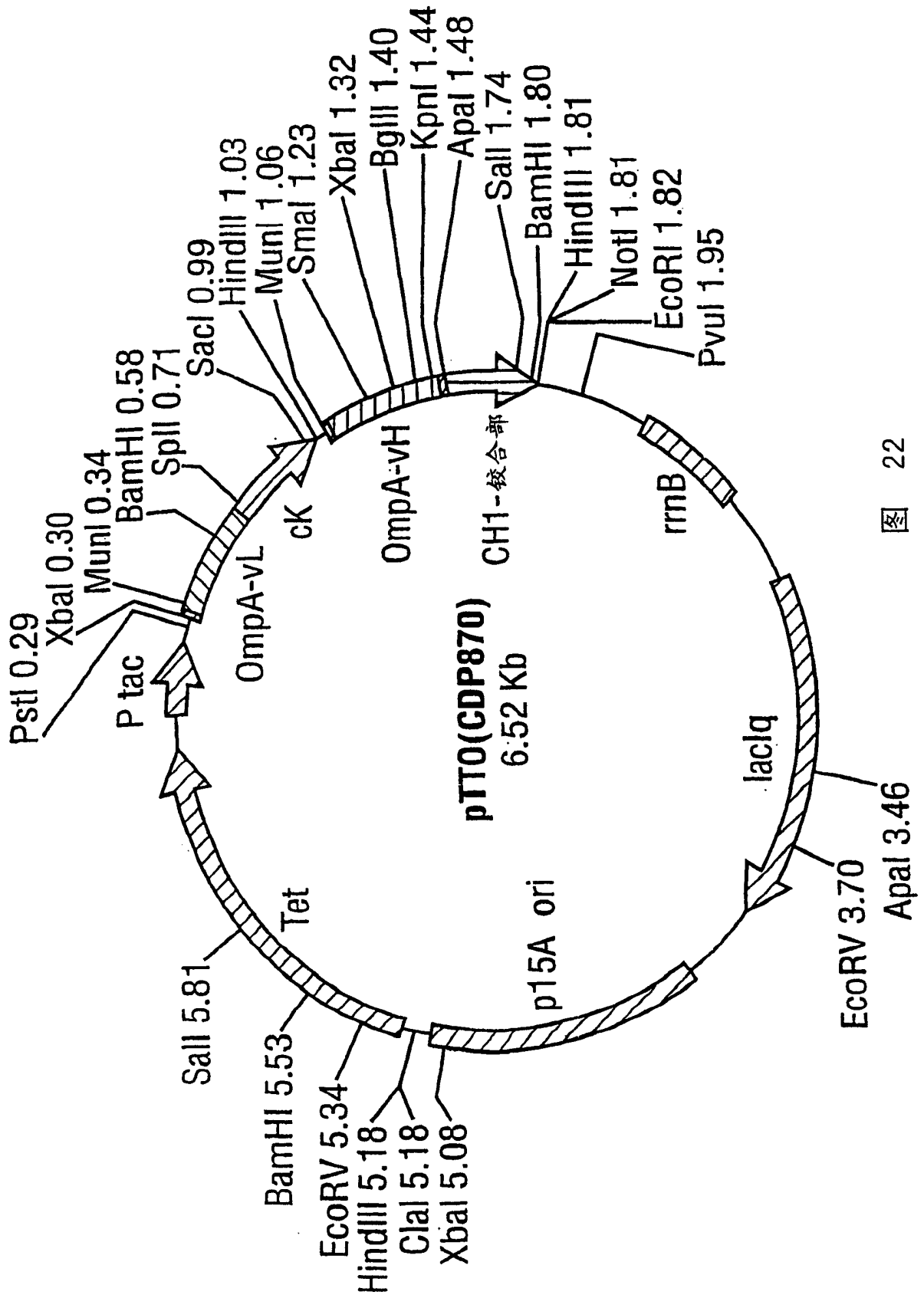


图 22

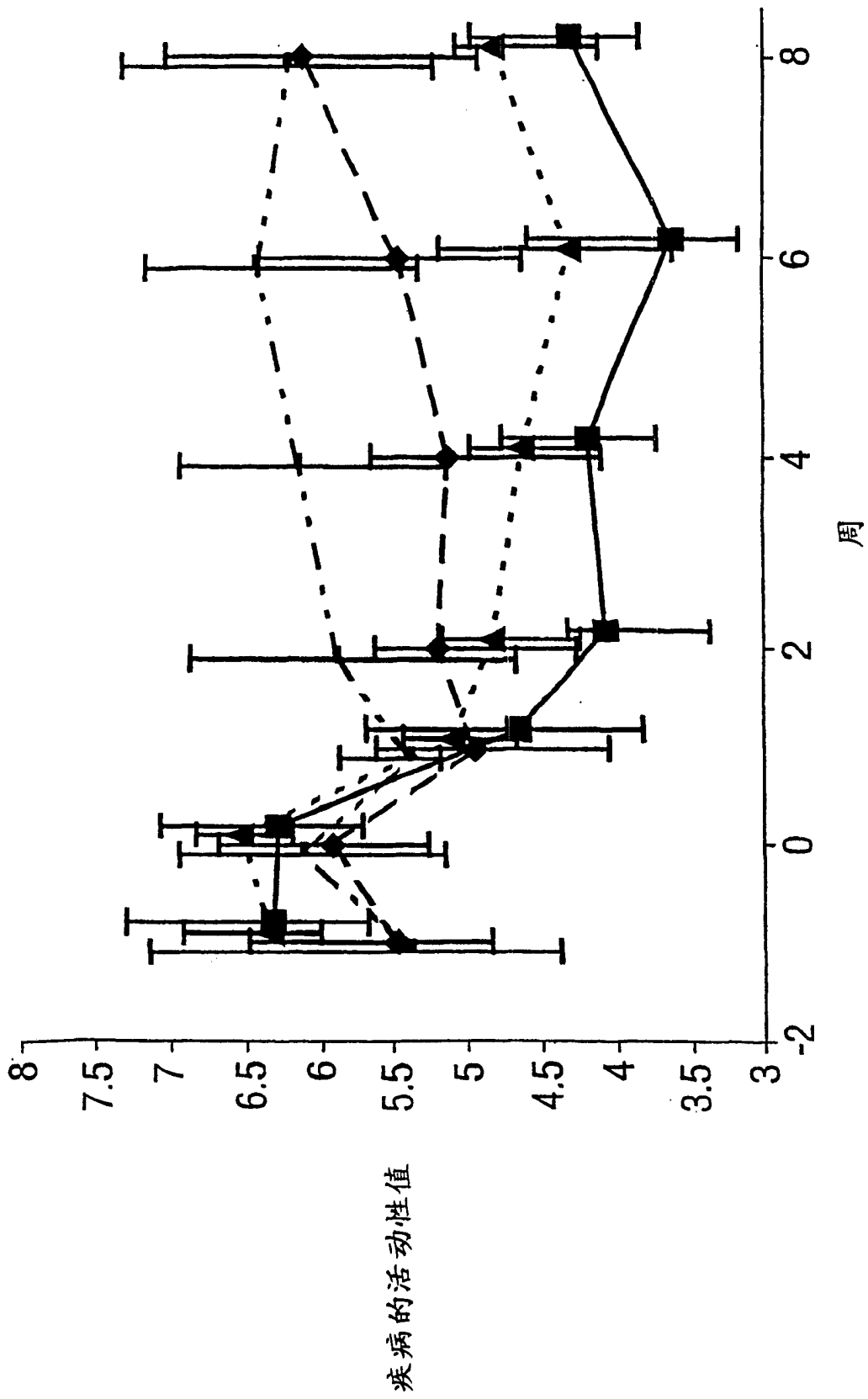
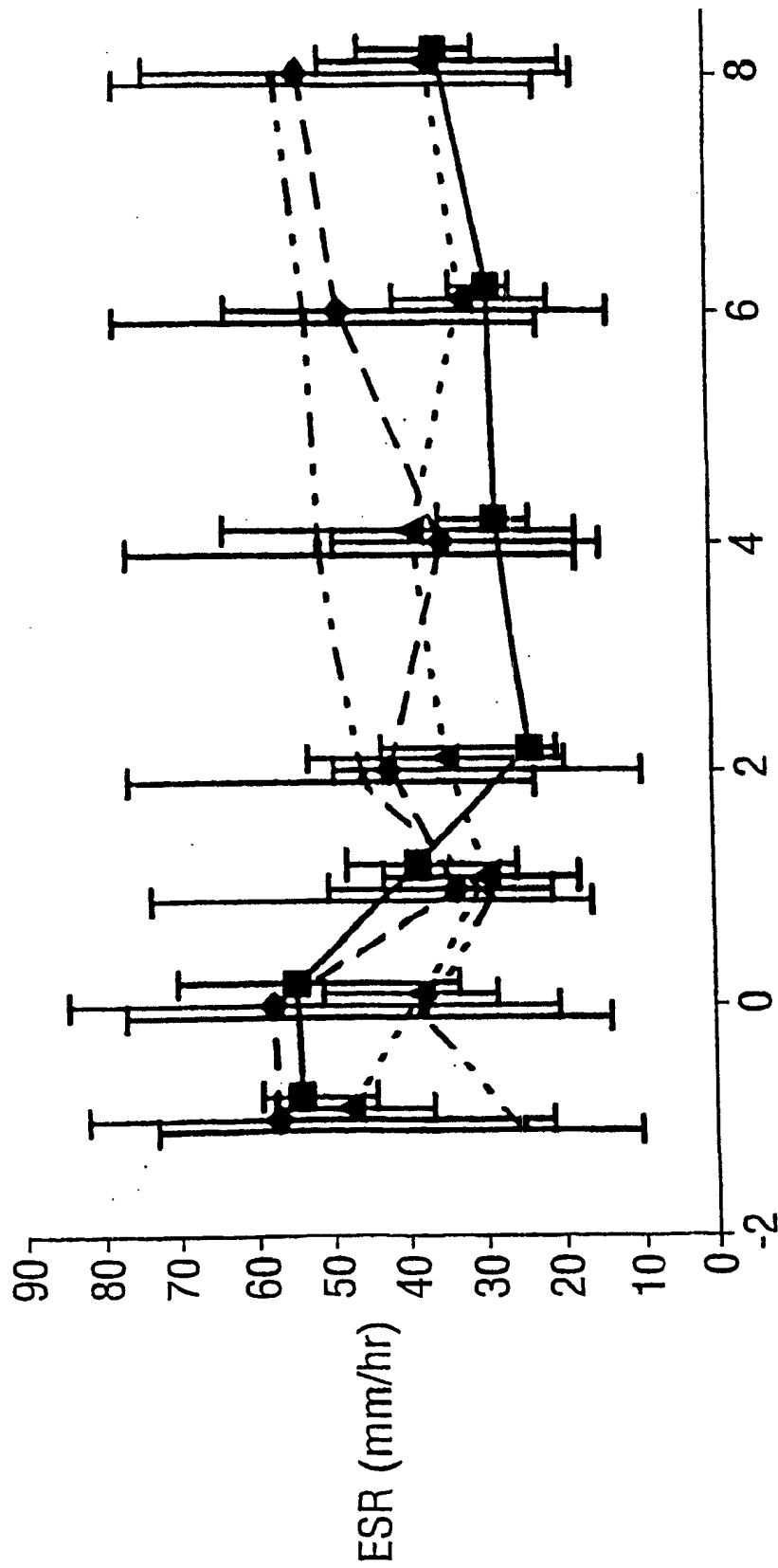


图 23



周

图 24

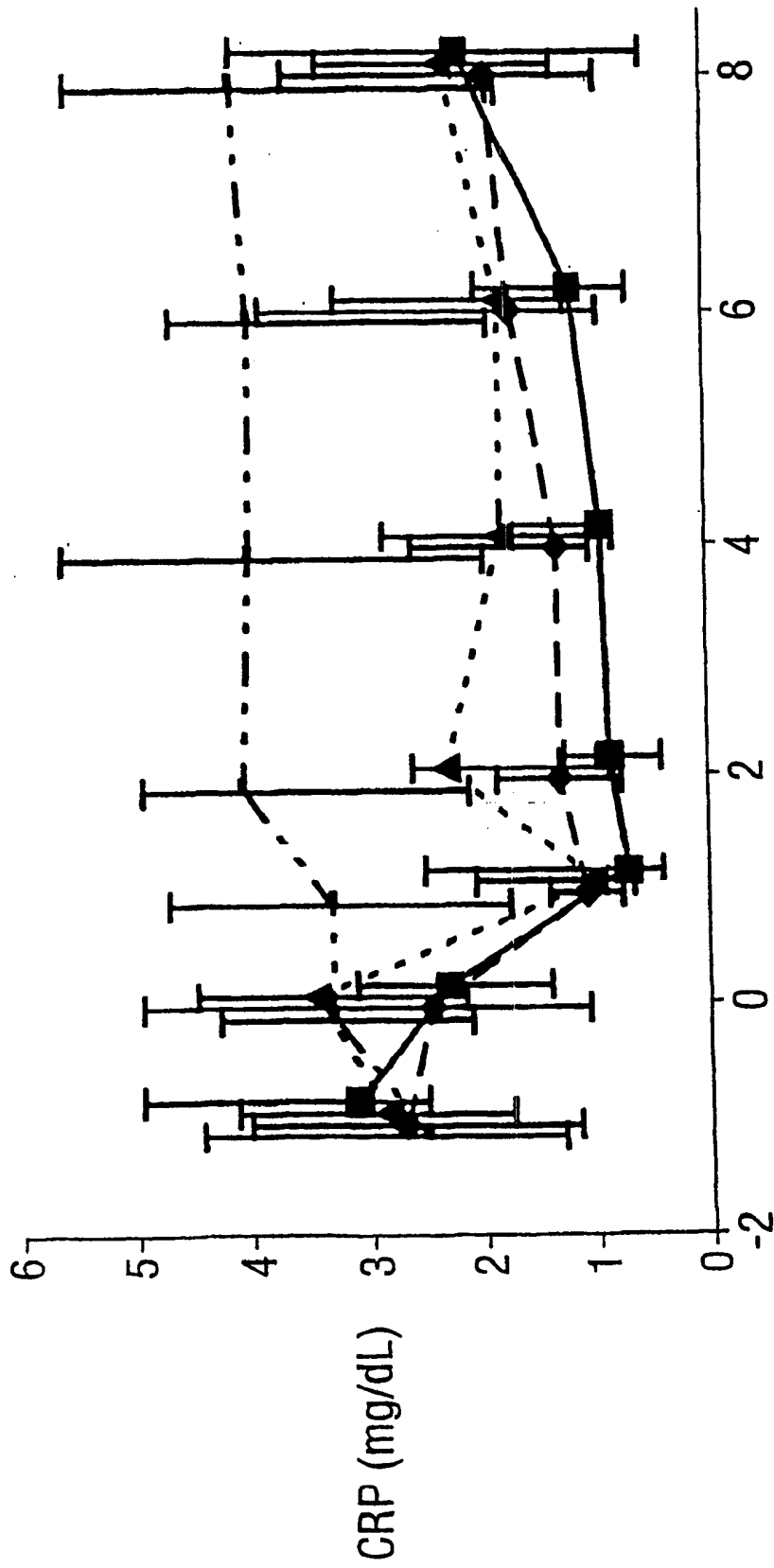


图 24 (继续)

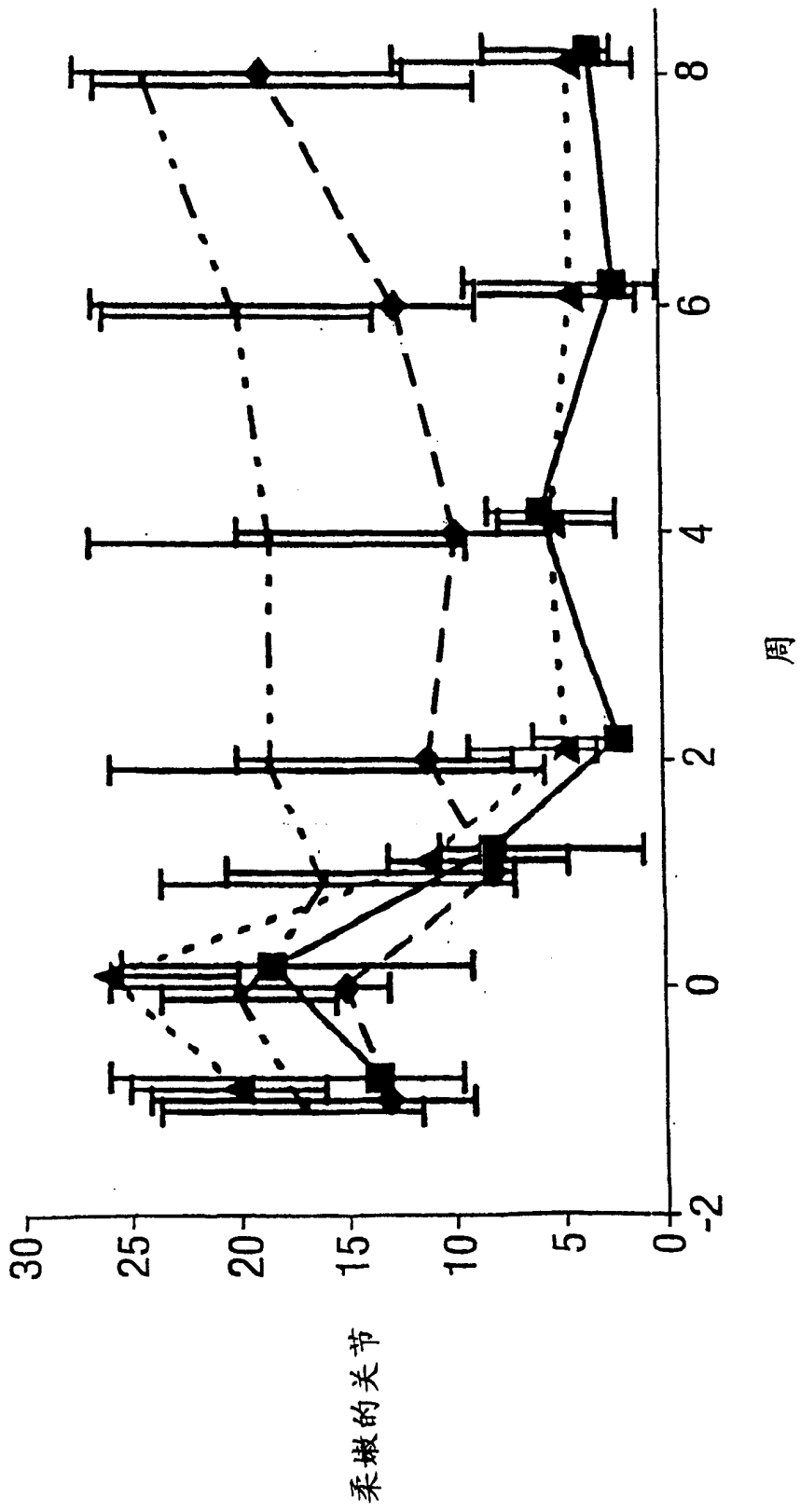


图 24(继续)

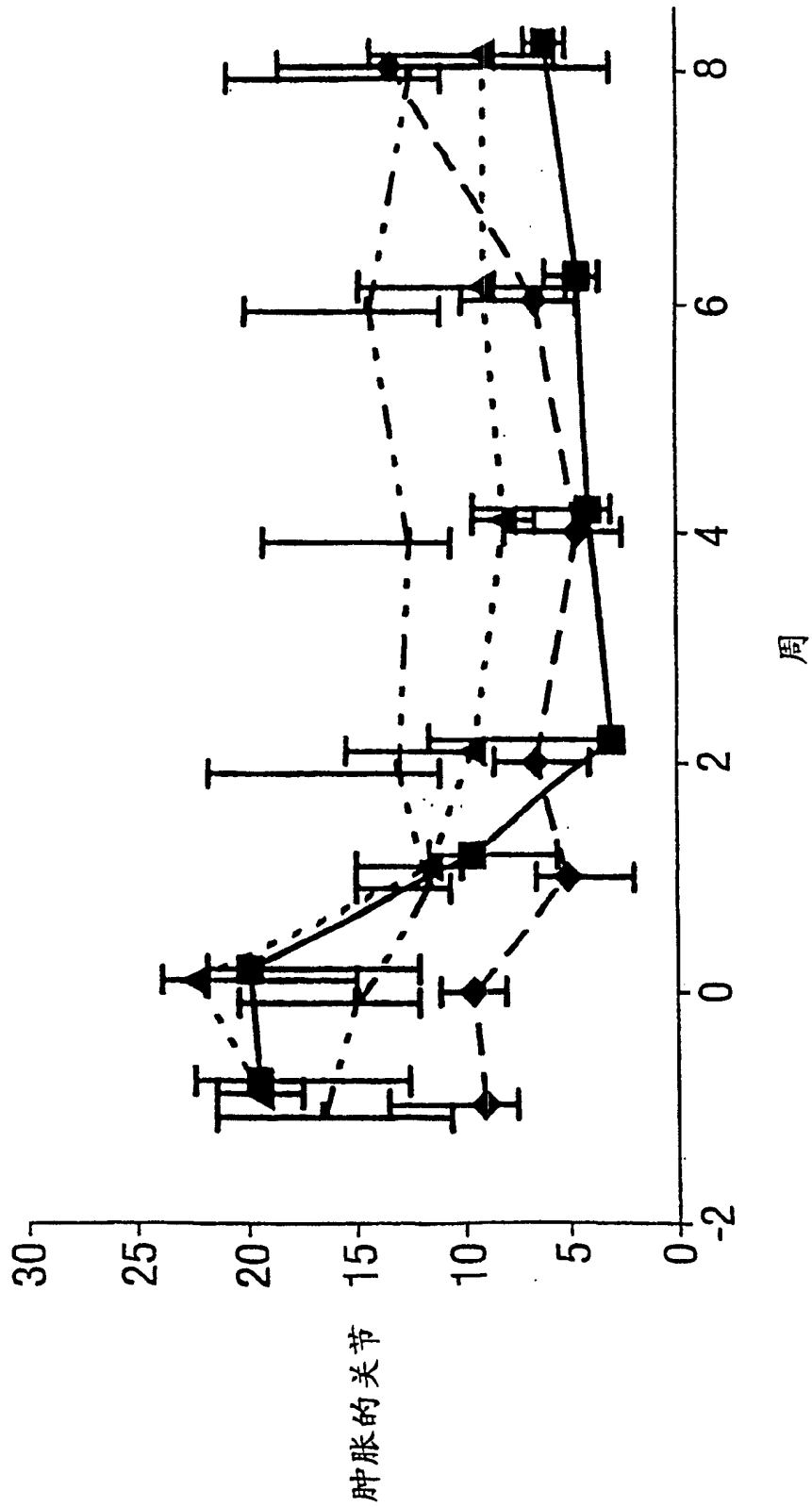


图 24 (继续)



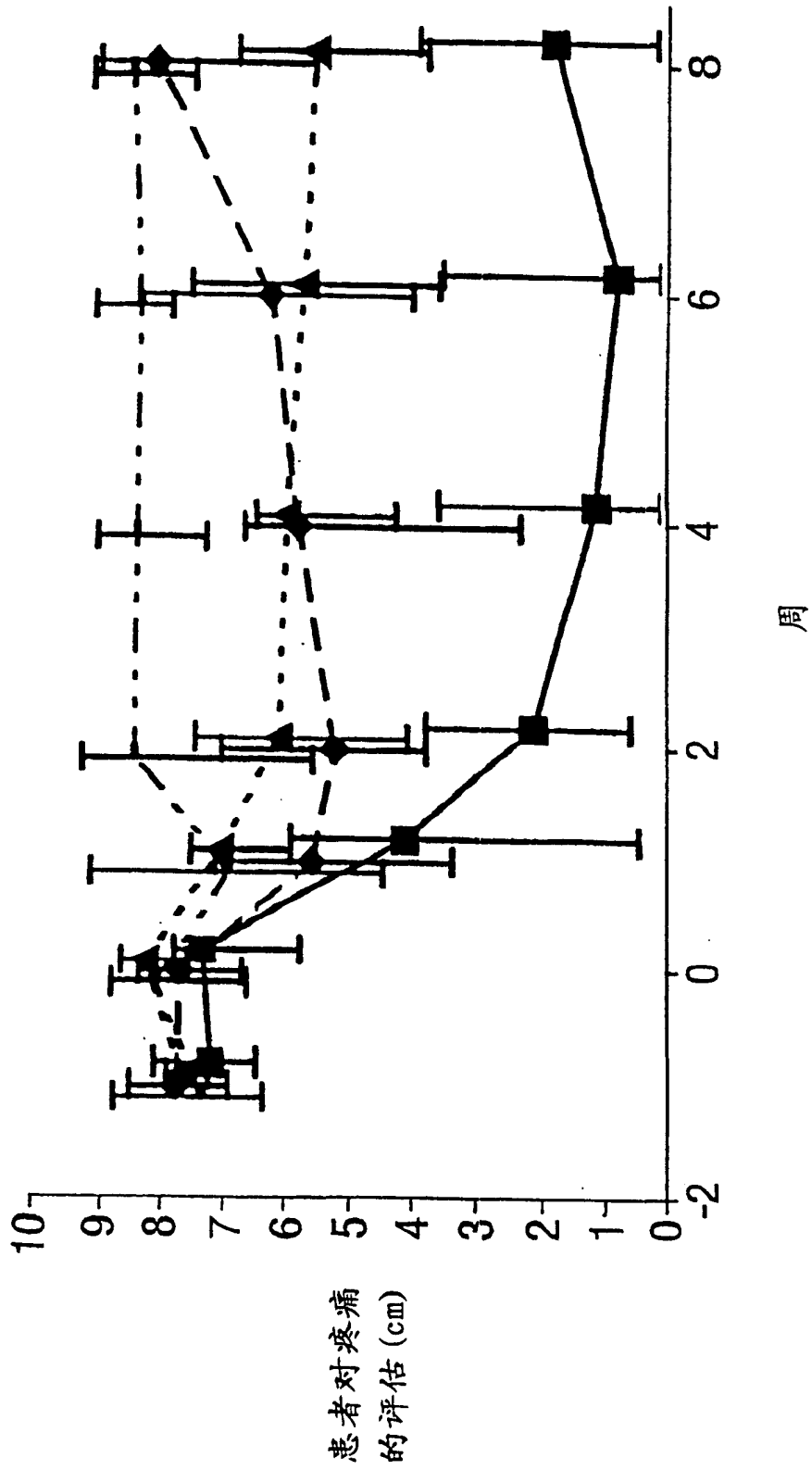


图 24 (继续)

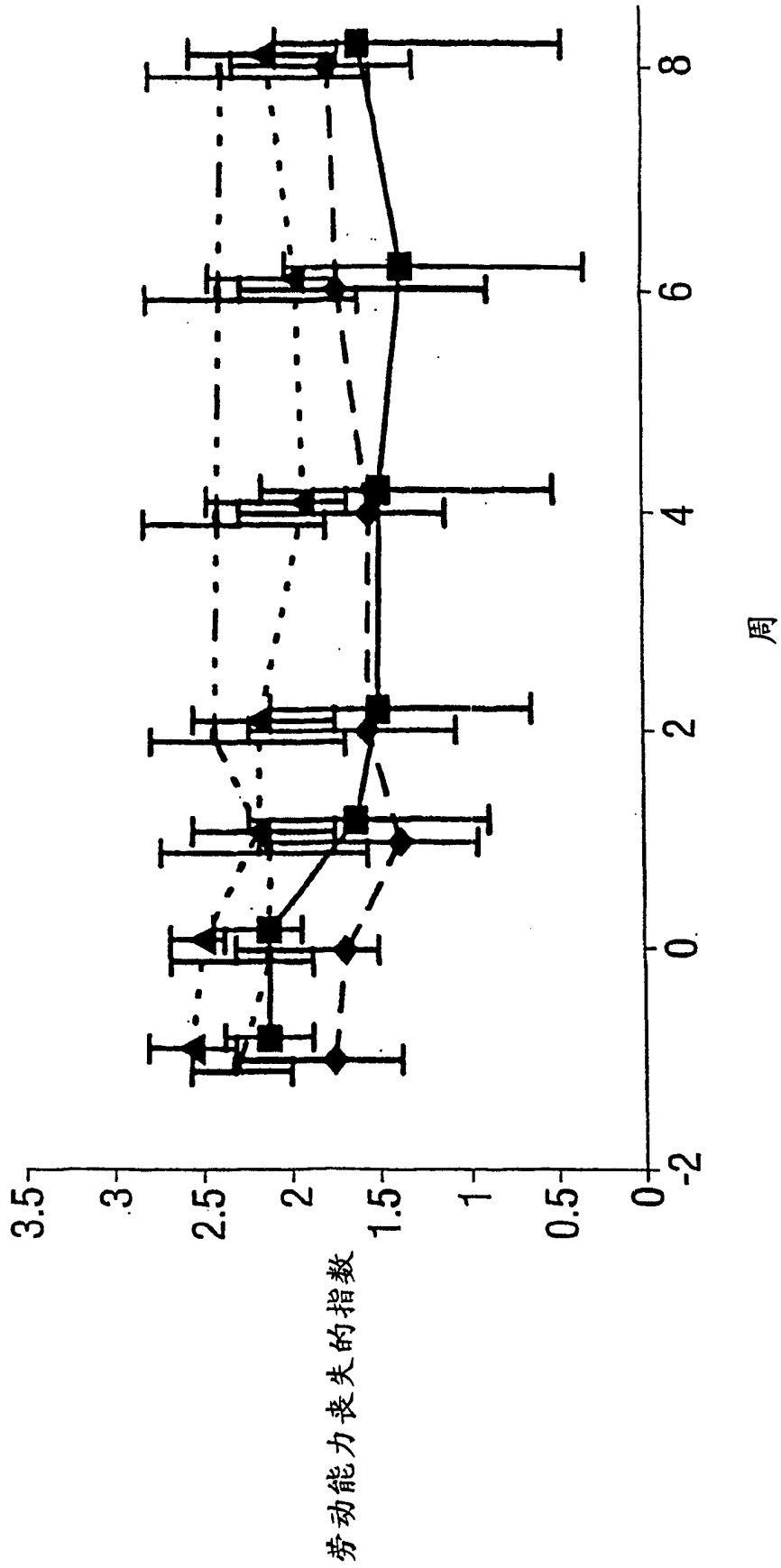


图 24(继续)

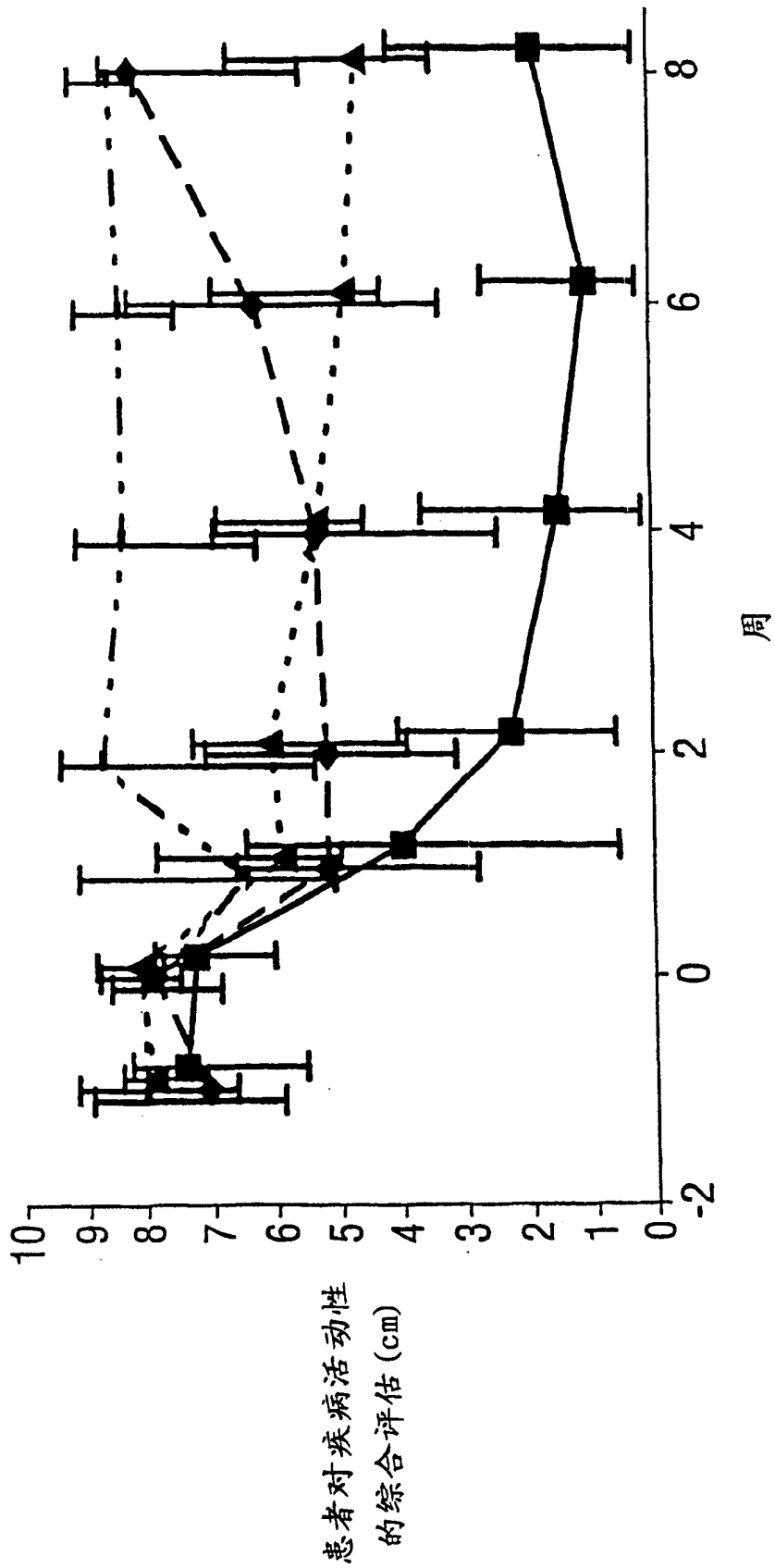


图 24 (继续)

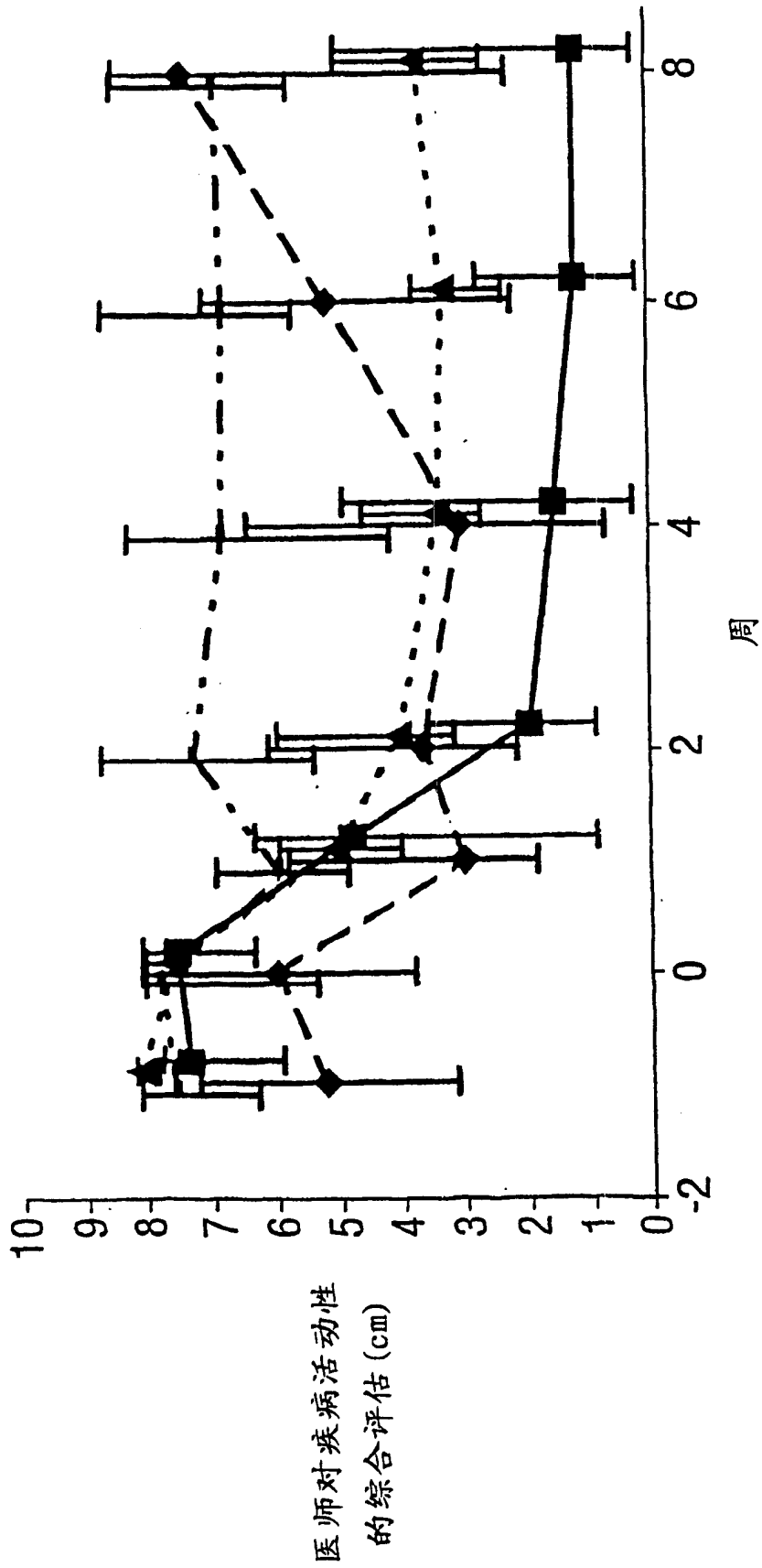


图 24(继续)