

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: 2002-837
(22) Přihlášeno: 05.06.2001
(30) Právo přednosti: 06.06.2000 GB 2000/13810
(40) Zveřejněno: 15.05.2002
(Věstník č. 5/2002)
(47) Uděleno: 18.06.2009
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 29.07.2009
(Věstník č. 30/2009)
(86) PCT číslo: PCT/GB2001/002477
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 2001/094585

(11) Číslo dokumentu:

300 737

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:
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)
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)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 98/25971; WO 92/11383; WO 99/64460; EP 0380068.

Stephens S. et al.: „Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses“, Immunology, vol. 85, no. 4, 668-674, 1995.

(73) Majitel patentu:

UCB Pharma S.A., 1070 Brussels, BE

(72) Původce:

Athwal Diljeet Singh, Slough, GB
Brown Derek Thomas, Slough, GB
Weir Andrew Neil Charles, Slough, GB
Poplewell Andrew George, Slough, GB
Chapman Andrew Paul, Slough, GB
King David John, Belmont, CA, US

(74) Zástupce:

Společná advokátní kancelář Všetečka Zelený Švorčík
Kalenský a partneři, JUDr. Miloš Všetečka, Hálkova 2,
Praha 2, 12000

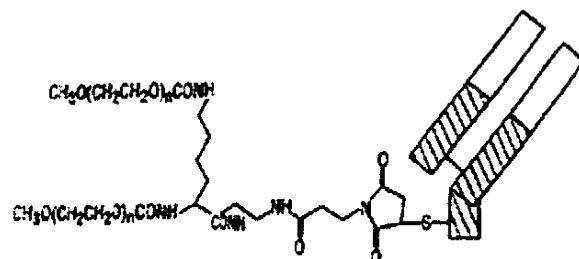
(54) Název vynálezu:

Molekula protilátky specifická pro humánní TNFalfa, sloučenina obsahující molekulu protilátky, sekvence DNA, klonovací nebo expresní vektor, hostitelská buňka, způsob přípravy molekuly protilátky, terapeutická nebo diagnostická kompozice a použití molekuly protilátky

(57) Anotace:

Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která obsahuje lehký řetězec a těžký řetězec, kde tento lehký řetězec obsahuje variabilní úsek lehkého řetězce hTNF40-gL1 (SEKV. ID. Č. 8) a těžký řetězec obsahuje variabilní úsek těžkého řetězce gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11), a způsob její přípravy. Sloučenina obsahující tuto molekulu protilátky, která obsahuje lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou skupinu odvozenou z lysyl-maleinimidové skupiny, kde každá ze dvou aminových skupin lisylových zbytků má kovalentně navázaný methoxypoly(ethylenglykol)ový zbytek o molekulové hmotnosti asi 20 000 Da, každý v aminoskupině lysylu, přičemž celková molekulová hmotnost methoxypoly(ethylenglykol)ových zbytků je asi 40 000 Da. Sekvence DNA kódující těžký a/nebo lehký řetězec molekuly

protilátky, klonovací nebo expresní vektor a hostitelský buňka transformovaná tímto vektorem. Terapeutická nebo diagnostická kompozice a použití molekuly protilátky pro léčení revmatoidní artritidy, osteoartritidy, Crohnovy nemoci nebo psoriázy.



CZ 300737 B6

Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , sloučenina obsahující molekulu protilátky, sekvence DNA, klonovací nebo expresní vektor, hostitelská buňka, způsob přípravy molekuly protilátky, terapeutická nebo diagnostická kompozice a použití molekuly protilátky

5

Oblast techniky

Vynález se týká molekul protilátky, které jsou specifické pro antigenní determinanty nádorového nekrotického faktoru alfa (TNF α , „tumour necrosis factor alpha“), sloučeniny obsahující molekulu této protilátky, sekvence DNA kódující těžký a/nebo lehký řetězec této molekuly protilátky, klonovacího nebo expresního vektoru obsahujícího uvedenou sekvenci DNA, hostitelské buňky transformované uvedeným vektorem, způsobu přípravy této molekuly protilátky, terapeutické nebo diagnostické kompozice a terapeutického použití této molekuly protilátky pro výrobu léčiva pro léčení nemoci zprostředkovaných TNF-alfa, konkrétně revmatoidní artritidy, osteoartritidy, Crohnovy nemoci nebo psoriázy.

15

Dosavadní stav techniky

20

Vynález se týká protilátek molekul. V molekule protilátky jsou dva těžké řetězce a dva lehké řetězce. Každý těžký řetězec a každý lehký řetězec má ve svém N-koncovém úseku variabilní doménu. Každá variabilní doména je složena ze čtyř rámcových úseků (FR, „framework region“), které jsou střídány se třemi úseky určujícími komplementaritu (CDR, „complementarity determining region“). Zbytky ve variabilní doméně jsou dohodou číslovány podle systému navrženého autory Kabat a kol. Tento systém je uveden v práci autorů *Kabat a kol., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIEI, USA* (dále „Kabat a kol. (viz výše)“). Tento systém číslování byl také použit v předkládaném popisu, pokud není uvedeno jinak.

25

30

Kabatovo označení zbytků neodpovídá vždy přímo lineárnímu číslování aminokyselinových zbytků. Aktuální lineární aminokyselinová sekvence může obsahovat méně aminokyselin nebo další aminokyseliny, než v přesném Kabatově číslování, což odpovídá zkrácení strukturální složky nebo vložení (inzercí) do strukturální složky, ať už do úseku rámce nebo do CDR, základní struktury variabilní domény. Správné Kabatovo číslování zbytků může být pro danou protilátku zjištěno porovnáním homologie zbytků v sekvenci protilátky se „standardní“ sekvencí číslovanou dle Kabata.

35

CDR variabilních domén těžkého řetězce jsou lokalizovány ve zbytcích 31 až 35 (CDRH1), zbytcích 50 až 65 (CDRH2) a zbytcích 95 až 102 (CDRH3) podle Kabatova číslování.

40

CDR variabilních domén lehkého řetězce jsou lokalizovány ve zbytcích 24 až 34 (CDRL1), zbytcích 50 až 56 (CDRL2) a zbytcích 89 až 97 (CDRL3) podle Kabatova číslování.

45

Konstrukce CDR-roubovaných protilátek je popsána v evropské patentové přihlášce EP A 0239400, která popisuje postup, kterým jsou CDR myší monoklonální protilátky jsou roubovány do úseků rámce variabilních domén humánního imunoglobulinu místně cílenou mutagenezí s použitím dlouhých oligonukleotidů. CDR určují specifitost vazby antigenu protilátkami a jsou to relativně krátké peptidové sekvence nesené v úsecích rámce variabilních domén.

50

Rané práce týkající se humanizace monoklonálních protilátek prostřednictvím CDR-roubování byly prováděny na monoklonálních protilátkách rozpoznávajících syntetické antigeny, jako je například NP. Ale byly popsány příklady, ve kterých myší monoklonální protilátka rozpoznávající lysozym a monoklonální protilátka laboratorního potkana rozpoznávající antigen na humánních T lymfocytech byly humanizovány pomocí CDR-roubování, a to autory Verhoeyen a kol.

55

(*Science*, 239, 1534–1536, 1988) a *Riechmann a kol.* (*Nature*, 332, 323–324, 1988), v daném pořadí.

5 Riechmann a kol., zjistili, že transfer samotných CDR (jak definovány Kabatem (*Kabat a kol. (výše)*) a *Wu a kol.*, *J. Exp. Med.*, 132, 211–250, 1970)) nebyl postačující pro vznik uspokojivé aktivity vázající antigen u CDR–roubovaného produktu. Bylo zjištěno, že musí být změněn velký počet zbytků rámce tak, aby odpovídaly zbytkům úseku rámce dárce. Navrhovaná kritéria pro výběr, které zbytky rámce potřebují být změněny, jsou popsána v mezinárodní patentové přihlášce WO 90/07861.

10

Publikován byl velký počet přehledů pojednávajících o CDR–roubovaných protilátkách, včetně Vaughan a kol. (*Nature Biotechnology*, 16, 535–539, 1998).

15 TNF α je pro–zánětlivý cytokin, který je uvolňován buňkami imunitního systému a interaguje s nimi. Tedy, TNF α je uvolňován makrofágy, které byly aktivovány lipopolysacharidy (LPS) z gram–negativních bakterií. Ukazuje se, že TNF α je endogenní mediátor ústředního významu zapojený do rozvoje a patogeneze endotoxického šoku spojeného s bakteriální sepsí. Bylo také zjištěno, že se zvyšuje počet receptorů pro TNF α u velkého počtu nemocí člověka, včetně chronických nemocí, jako je například revmatoidní artritida, Crohnova nemoc, ulcerativní kolitida a scierosis multiplex. Myši transgenní pro humánní TNF α produkují konstitutivně vysokou hladinu TNF α a vyvíjí se u nich spontánní, destruktivní polyarthritis připomínající revmatoidní arthritidu (Kaffer a kol., *EMBO J.*, 10, 4025–4031, 1991). TNF α je tudíž nazýván pro–zánětlivý cytokin.

25 Ve stavu techniky byl popsány monoklonální protilátky proti TNF α . Meager a kol., (*Hybridoma*, 6, 305–311, 1987) popsali myší monoklonální protilátky proti rekombinantnímu TNF α . Fendly a kol., (*Hybridoma*, 6, 359–370, 1987) popsali použití myších monoklonálních protilátek proti rekombinantnímu TNF α při definování neutralizaci epitopů na TNF. Shimamoto a kol., (*Immunology Letters*, 17, 311–318, 1988) popsali použití myších monoklonálních protilátek proti TNF γ a jejich použití při prevenci endotoxického šoku u myší. Dále, v mezinárodní publikované patentové přihlášce WO 92/11383, jsou popsány rekombinantní protilátky, včetně CDR–roubovaných protilátek, specifických pro TNF α . Rankin a kol., (*British J. Rheumatology*, 34, 334–342, 1995) popsali použití těchto CDR–roubovaných protilátek v léčení revmatoidní artritidy. V patentu Spojených států amerických US A 5 919 452 popisuje anti–TNF chimérické protilátky a jejich použití v léčení patologických stavů spojených s výskytem TNF.

30 Protilátky k TNF α byly navrženy pro profylaxi a léčení endotoxického šoku (*Beutler a kol.* *Science*, 234, 470–474, 1985). Bodmer a kol., (*Critical Care Medicine*, 21, S441–S446, 1993) a Wherry a kol., (*Critical Care Medicine*, 21, S436–S440, 1993) pojednávají terapeutický potenciál anti–TNF α protilátek v léčení septického šoku. Použití anti–TNF α protilátek v léčení septického šoku je také projednáváno autory Kirschenbaum a kol., (*Critical Care Medicine*, 26, 1625–1626, 1998). Arthritida vyvolaná kolagenem může být účinně léčena použitím anti–TNF α monoklonálních protilátek (*William a kol.* (*PNAS–USA*, 89, 9784–9788, 1992)).

45 U pacientů trpících revmatoidní artritidou byly zjištěny zvýšené hladiny TNF α jak v synoviální tekutině, tak v periferní krvi. Když jsou pacientovi trpícím revmatoidní artritidou podávána agens blokující TNF α , zmírňují zánět, zlepšují symptomy a oddalují poškození kloubu (*McKown a kol.* (*Arthritis Rheum.*, 42, 1204–1208, 1999)).

50 Použití anti–TNF α protilátek v léčení revmatoidní artritidy a Crohnovy nemoci je diskutováno v práci autorů Feldman a kol., (*Transplantation Proceedings*, 30, 4126–4127, 1998), Adorini a kol., (*Trends in Immunology Today*, 18, 209–211, 1997) a v Feldman a kol., (*Advances in Immunology*, 64, 283–350, 1997). Protilátky k TNF α použité v těchto léčebných postupech jsou obecně chimérické protilátky, jako například ty popsané v US A 5 919 452.

55

kde n je asi 420.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží sekvence DNA kódující těžký a/nebo lehký řetězec molekuly protilátky specifikované výše.

5

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží klonovací nebo expresní vektor obsahující sekvenci DNA specifikovanou výše.

10

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží hostitelská buňka transformovaná vektorem specifikovaným výše.

15

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob přípravy molekuly protilátky specifikované výše, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje kroky, kdy se kultivuje hostitelská buňka specifikovaná výše a izoluje se molekula protilátky.

20

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží terapeutická nebo diagnostická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje molekulu protilátky specifikované výše nebo sloučeninu obsahující molekulu protilátky specifikovanou výše se spojením s farmaceuticky přijatelnou nosičovou látkou.

25

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží molekula protilátky specifikovaná výše nebo sloučenina obsahující molekulu protilátky specifikovanou výše pro použití v terapii.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží použití molekuly protilátky specifikované výše nebo sloučeniny obsahující molekulu protilátky specifikované výše pro výrobu léčiva pro léčení revmatoidní artritidy, osteoartritidy, Crohnovy nemoci nebo psoriázy.

30

Vynález popisuje protilátkovou molekulu, která je specifická pro TNF α , obsahující těžký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak definováno Kabatem a kol., (viz výše)) mající sekvenci označenou jako H1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 1) pro CDRH1, H2' na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 2) nebo H2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 7) pro CDRH2 nebo H3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 3) pro CDRH3.

35

Tato protilátková molekula podle prvního aspektu obsahuje alespoň jeden CDR vybraný z H1, H2' nebo H2 a H3 (SEKV. ID. Č. 1, SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 7 a SEKV. ID. Č. 3) pro variabilní doménu těžkého řetězce. Výhodně, protilátková molekula obsahuje alespoň dva a výhodněji všechny tři CDR ve variabilní doméně těžkého řetězce.

40

Vynález dále popisuje protilátkové molekuly specifické pro humánní TNF α podle druhého aspektu, obsahující lehký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak definováno Kabatem a kol., (výše)) mající sekvenci označenou jako L1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 4) pro CDRL1, L2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 5) pro CDRL2 nebo L3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 6) pro CDRL3.

45

Tato protilátková molekula obsahuje alespoň jeden CDR vybraný z L1, L2 a L3 (SEKV. ID. Č. 4 až SEKV. ID. Č. 6) pro variabilní doménu lehkého řetězce. Výhodně, protilátková molekula obsahuje alespoň dva a výhodněji všechny tři CDR ve variabilní doméně lehkého řetězce.

50

Protilátkové molekuly podle prvního a druhého aspektu podle předkládaného vynálezu výhodně mají komplementární lehký řetězec nebo komplementární těžký řetězec, v daném pořadí.

55

Protilátková molekula podle prvního nebo druhého aspektu předkládaného vynálezu obsahuje výhodně těžký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak je definováno Kabatem a kol., (viz výše)) mající sekvenci označenou jako H1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 1) pro CDRH1, H2' nebo H2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 7) pro CDRH2 nebo H3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 3) pro CDRH3 a lehký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR

(jak definováno Kabatem a kol., (viz výše)) mající sekvenci označenou jako L1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 4) pro CDRL1, L2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 5) pro CDRL2 nebo L3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 6) pro CDRL3.

5 CDR označené v SEKV. ID. Č. 1 a 3 až 7 a na obrázku 3, uvedené výše, pocházejí z myší monoklonální protilátky hTNF40. Ale SEKV. ID. Č. 2 se skládá z hybridního CDR. Hybridní CDR obsahuje část těžkého řetězce CDR2 z myší monoklonální protilátky hTNF40 (SEKV. ID. Č. 7) a část těžkého řetězce CDR2 z humánní skupiny 3 zárodečné linie sekvence úseku V.

10 Kompletní sekvence variabilních domén myší hTNF40 protilátky jsou ukázány na obrázku 6 (lehký řetězec) (SEKV. ID. Č. 99) a obrázku 7 (těžký řetězec) (SEKV. ID. Č. 100). Myší protilátka je nazývána níže „dárcovská protilátka“.

15 První výhodné provedení prvního nebo druhého aspektu zahrnuje myší monoklonální protilátku hTNF40 mající sekvence variabilní domény lehkého a těžkého řetězce ukázané na obrázku 6 (SEKV. ID. Č. 99) a obrázku 7 (SEKV. ID. Č. 100), v daném pořadí. Konstantní úsek lehkého řetězce hTNF40 je kappa a konstantní úsek těžkého řetězce je IgG2a.

20 V druhém výhodném provedení je protilátka podle prvního a druhého aspektu chimérická myší/humánní protilátková molekula, nazývaná v tomto textu chimérická hTNF40 protilátková molekula. Chimérická protilátková molekula obsahuje variabilní domény myší monoklonální protilátky hTNF40 (SEKV. ID. Č. 99 a 100) a humánní konstantní domény. Výhodně, chimérická hTNF40 protilátková molekula obsahuje humánní C kappa doménu (*Hieter a kol., Cell, 22, 197–207, 1980, Genebank přístupové číslo J00241*) v lehkém řetězci a humánní gama 4 domény (*Flanagan a kol., Nature, 300, 709–713, 1982*) v těžkém řetězci.

30 Ve třetím výhodném provedení je protilátka podle prvního a druhého aspektu CDR–roubovaná protilátková molekula. Termín „CDR–roubovaná protilátková molekula“, použitý v tomto textu, se týká protilátkové molekuly, kde těžký a/nebo lehký řetězec obsahují jeden nebo více CDR (včetně, je-li to žádoucí, hybridního CDR) z donorové (dárcovské) protilátky (například myší monoklonální protilátky) naroubované na variabilní úsek rámce těžkého a/nebo lehkého řetězce akceptorové (příjemcovské) protilátky (například humánní protilátky).

35 Výhodně má tato CDR–roubovaná protilátka variabilní doménu obsahující úseky rámce humánního příjemce, a také jeden nebo více dárcovských CDR uvedených výše.

40 V případě, že jsou CDR roubovány, může být použita každá vhodná sekvence příjemce variabilního úseku rámce s ohledem na třídu/typ dárcovské protilátky, ze které CDR pocházejí, včetně úseků rámce myši, primáta a člověka. Příklady humánních rámců (rámcových úseků protilátky), které mohou být použity v předkládaném vynálezu, jsou KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY a POM (Kabat a kol. (viz výše)). Například, KOL a NEWM mohou být použity pro těžký řetězec, REI může být použit pro lehký řetězec a EU, LAY a POM mohou být použity pro oba těžký i lehký řetězec. Výhodné úseky rámce pro lehký řetězec jsou humánní skupina 1 úseků rámce ukázaná na obrázku 1 (SEKV. ID. Č. 83, 85, 87 a 89). Výhodné úseky rámce pro těžký řetězec jsou humánní skupina 1 a skupina 3 úseků rámce ukázané na obrázku 2 (SEKV. ID. Č. 45 91, 93, 95 a 97 a SEKV. ID. Č. 106, 107, 108 a 109), v daném pořadí.

50 U CDR–roubovaných protilátek je výhodné použít jako příjemcovskou protilátku takovou, která má řetězce, které jsou homologní k řetězcům dárcovské protilátky. Příjemcovské těžké a lehké řetězce nemusí nezbytně pocházet ze stejné protilátky a mohou, je-li žádoucí, obsahovat složené řetězce mající úseky rámce pocházející z odlišných řetězců.

55 V CDR–roubovaných protilátkách podle předkládaného vynálezu nemusí mít také úseky rámce přesně tutéž sekvenci, jako je sekvence příjemcovské protilátky. Například, neobvyklé zbytky mohou být změněny na častěji se vyskytující zbytky pro danou třídu nebo typ příjemcovského

řetězce. Alternativně, vybrané zbytky v příjemcovských úsecích rámce mohou být změněny tak, že odpovídají zbytku nalezenému ve stejné poloze v dárcovské protilátce. Takové změny by měly být udržovány na minimu nezbytném k obnově afinity dárcovské protilátky. Protokol pro selekci zbytků v příjemcovských úsecích rámce, které mohou potřebovat změnu, je uveden ve
5 WO 91/09967.

Ve výhodném provedení, v CDR–roubované protilátkové molekule podle předkládaného vynálezu, jestliže příjemcovský těžký řetězec má úseky rámce z humánní skupiny 1 (ukázáno na obrázku 2) (SEKV. ID. Č. 91, 93, 95 a 97), pak příjemcovské úseky rámce těžkého řetězce
10 obsahují, navíc k jednomu nebo více dárcovským CDR, dárcovské zbytky v polohách 28, 69 a 71 (podle Kabat a kol. (viz výše)).

Alternativně, jestliže příjemcovský těžký řetězec má úseky rámce ze skupin 1, pak příjemcovské úseky rámce těžkého řetězce obsahují, navíc k jednomu nebo více dárcovským CDR, dárcovské
15 zbytky v polohách 28, 38, 46, 67, 69 a 71 (podle Kabat a kol. (viz výše)).

Ve výhodném provedení, v CDR–roubované protilátkové molekule podle předkládaného vynálezu, jestliže příjemcovský těžký řetězec má úseky rámce humánní skupiny 3 (ukázáno na obrázku 2) (SEKV. ID. Č. 106, 107, 108 a 109), pak příjemcovské úseky rámce těžkého řetězce obsahují,
20 navíc k jednomu nebo více dárcovským CDR, dárcovské zbytky v polohách 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 a 78 (podle Kabat a kol. (viz výše)).

Ve výhodném provedení, v CDR–roubované protilátkové molekule podle předkládaného vynálezu, jestliže příjemcovský lehký řetězec má úseky rámce humánní skupiny 1 (ukázáno na obrázku 1) (SEKV. ID. Č. 83, 85, 87 a 89), pak příjemcovské úseky rámce lehkého řetězce
25 obsahují dárcovské zbytky v polohách 46 a 60 (podle Kabat a kol. (viz výše)).

Dárcovské zbytky jsou zbytky z dárcovské protilátky, tj. protilátky, ze které původně pocházejí CDR.
30

Protilátková molekula může obsahovat: kompletní protilátkovou molekulu, mající kompletní těžké a lehké řetězce, její fragment, jako například Bab, modifikovaný Fab, Fab', F(ab')₂ nebo Fv fragment, monomer nebo dimer lehkého řetězce nebo těžkého řetězce, protilátka s jedním řetězcem, např. jednořetězcová Fv, ve které jsou variabilní domény těžkého a lehkého řetězce spojeny
35 peptidovou spojkou. Podobně, variabilní úseky těžkého a lehkého řetězce mohou být spojeny s další protilátkovou doménou, jak je to vhodné.

Ve výhodném provedení je protilátková molekula podle předkládaného vynálezu Fab fragment. Výhodně Fab fragment má těžký řetězec mající sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 111 a lehký řetězec mající sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 113. Aminokyselinové sekvence
40 uvedené v SEKV. ID. Č. 111 a SEKV. ID. Č. 113 jsou výhodně kódovány nukleotidovými sekvencemi uvedenými v SEKV. ID. Č. 110 a SEKV. ID. Č. 112, v daném pořadí.

Alternativně je výhodné, jestliže protilátkovou molekulou podle předkládaného vynálezu je modifikovaný Fab fragment, kde modifikace je připojena na C–koncovou část jeho těžkého řetězce jedné nebo více aminokyselin, aby se umožnilo připojení efektorové nebo reportérové
45 molekuly. Výhodně, další aminokyseliny tvoří modifikovaný kloubový úsek obsahující jeden nebo dva cysteinové zbytky, ke kterým může být připojena efektorová nebo reportérová molekula. Takto modifikovaný Fab fragment má výhodně těžký řetězec mající sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 115 a lehký řetězec mající sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 113. Aminokyselinová sekvence uvedená v SEKV. ID. Č. 115 je výhodně kódována nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEKV. ID. Č. 114.
50

Výhodná efektorová skupina je molekula polymeru, která může být připojena k modifikovanému Fab fragmentu, aby se zvýšil jeho biologický poločas in vivo.
55

Polymerové molekuly mohou být obecně syntetické nebo v přírodě se vyskytující polymery, například případně substituovaný polyalkylenový polymer, polyalkenylenový polymer nebo polyoxyalkylenový polymer s přímým nebo rozvětveným řetězcem, nebo polysacharid s rozvětveným nebo nerozvětveným řetězcem, například homo- nebo hetero- polysacharid.

Mezi konkrétní případné substituenty, které mohou být přítomny na výše uvedených syntetických polymerech, patří jedna nebo více hydroxyskupin, methylových skupin nebo methoxyskupin. Konkrétní příklady syntetických polymerů zahrnují případně substituovaný poly(ethylenglykol), poly(propylenglykol), poly(vinylalkohol) nebo jejich deriváty s přímými nebo rozvětvenými řetězci, zejména případně substituovaný poly(ethylenglykol), jako je například methoxypoly(ethylenglykol) nebo jejich deriváty. Konkrétní v přírodě se vyskytující polymery zahrnují laktózu, amylozu, dextran, glykogen nebo jejich deriváty. Termín „deriváty“, použitý v tomto textu, zahrnuje reaktivní deriváty, například thiol-selektivní reaktivní skupiny, jako jsou například maleimidy, apod. Reaktivní skupina může být připojena k polymeru přímo nebo přes spojovací segment. Je nutné uvést, že zbytek takové skupiny v některých případech tvoří část produktu jako spojovací skupina mezi proti látkovým fragmentem a polymerem.

Velikost polymeru může být variabilní podle dané potřeby, ale obecně odpovídá průměrnému rozmezí molekulových hmotností od 500 (Da) do 50000 (Da), výhodně 5000 až 40000 (Da) a výhodněji 25000 až 40000 (Da). Velikost polymeru může být konkrétně vybrána na základě zamýšleného použití produktu. Tedy například, v případě, kdy je cílem to, aby produkt opustil cirkulaci a pronikl do tkání, například pro použití při léčení nádorů, může být výhodné použít polymer s nízkou molekulovou hmotností, například s molekulovou hmotností přibližně 5000 (Da). Pro aplikace, při kterých produkt v cirkulaci zůstává, může být výhodné použít polymer s vyšší molekulovou hmotností, mající například molekulovou hmotnost v rozmezí 25000 (Da) až 40000 (Da).

Mezi obzvláště výhodné polymery patří polyalkylenové polymery, jako je například polyethylenglykol nebo, zejména, methoxypoly(ethylenglykol) nebo jejich deriváty a zejména polymery s molekulovou hmotností v rozmezí přibližně 25000 (Da) až přibližně 40000 (Da).

Každá molekula polymeru připojená k modifikovanému protilátkovému fragmentu může být kovalentně připojena k atomu síry cysteinového zbytku lokalizovaného ve fragmentu. Kovalentní vazba je obecně disulfidová vazba nebo, zejména, vazba mezi atomy síry a uhlíku.

V případě potřeby může mít protilátkový fragment připojenou jednu nebo více efektorových nebo reportérových molekul. Efektorové nebo reportérové molekuly mohou být připojeny k protilátkovému fragmentu přes kterýkoliv dostupný aminokyselinový postranní řetězec nebo terminální aminokyselinovou funkční skupinu ve fragmentu lokalizovanou, například jakoukoliv volnou aminoskupinu, iminoskupinu, hydroxylovou skupinu nebo karboxylovou skupinu.

Pro přípravu protilátkových fragmentů modifikovaných polymerem popsaných výše může být použit jako výchozí látka každý aktivovaný polymer. Aktivovaný polymer může být každý polymer obsahující thiolovou reaktivní skupinu, jako je například α -halogenkarboxylová kyselina nebo ester, například jodacetamid, imid, například maleimid, vinylsulfon nebo disulfid. Tato výchozí látka může být získána z komerčních zdrojů (například od firmy Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) nebo může být připravena z komerčně dostupných výchozích látek s použitím obvyklých chemických postupů.

Co se týče připojení poly(ethylenglykol)ových (PEG) skupin, je možno odkázat se na dokumenty „*Poly(ethylenglykol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*“, 1992, J. Million Harris (ed), Plenum Press, New York, „*Poly(ethylenglykol) Chemistry and Biological Applications*“, 1997, J. Milton Harris a S. Zalipsky (eds), American Chemical Society,

Washington DC a „Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Science“, 1998, M. Aslam a A. Dent, Grove Publishers, New York.

5 V případě, že je třeba získat protilátkový fragment připojený k efektorové nebo reportérové molekule, je možno přípravu provést standardními chemickými postupy nebo technikami rekombinantní DNA, kdy je protilátkový fragment spojen buď přímo nebo prostřednictvím kondenzačního činidla k efektorové nebo reportérové molekule buď před nebo po reakci s vhodným aktivovaným polymerem. Mezi konkrétní chemické postupy patří například postupy popsané v publikovaných mezinárodních patentových přihláškách WO 93/62331, WO 92/22583, WO 10 90/195 a WO 89/1476. Alternativně, v případě, že je efektorovou nebo reportérovou molekulou protein nebo polypeptid, může být spojení dosaženo s použitím postupů rekombinantní DNA, popsanych například v dokumentech WO 86/01533 a EP-A-0392745.

15 Ve výhodném provedení je modifikovaný Fab fragment podle předkládaného vynálezu PEGylován (tj. má k sobě kovalentně připojen PEG (polyethylenglykol)) podle metody popsané v EP-A-0948544. Výhodně je protilátkovou molekulou podle předkládaného vynálezu PEGylováný modifikovaný Fab fragment ukázaný na obrázku 13. Jak je ukázáno na obrázku 13, modifikovaný Fab fragment má maleimidovou skupinu kovalentně připojenou k jedné thiolové skupině v modifikovaném kloubovém úseku. K maleimidové skupině je kovalentně připojen 20 zbytek lysinu. Ke každé aminoskupině na lysinovém zbytku je připojen polymer methoxypoly(ethylenglykol)u mající molekulovou hmotnost přibližně 20000 (Da). Celková molekulová hmotnost celé efektorové molekuly je tudíž přibližně 40000 (Da).

25 Ve výhodném provedení má ve sloučenině ukázané na obrázku 13 těžký řetězec protilátkové části sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 115 a lehký řetězec má sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 113. Tato sloučenina je v tomto textu nazývána CDP870.

30 Domény konstantních úseků protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu, jestliže se vyskytují, mohou být vybírány s ohledem na navrhovanou funkci protilátkové molekuly a zejména efektorové funkce, které mohou být nezbytné. Například, domény konstantních úseků mohou být humánní domény IgA, IgD, IgE, IgG nebo IgM. Mohou být použity obzvláště domény konstantních úseků humánního IgG, zejména izotypy IgG1 a IgG3, a to v případech, kdy je protilátková molekula zamýšlena pro terapeutické použití a kdy jsou nezbytné protilátkové efektorové funkce. Alternativně, mohou být použity izotypy IgG2 a IgG4, a to v případě, kdy je 35 protilátková molekula zamýšlena pro terapeutické použití a protilátkové efektorové funkce nejsou nezbytné, například pro jednoduchou blokádu aktivity TNF α .

40 Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může mít také připojenou efektorovou nebo reportérovou molekulu. Například může mít připojen makrocyklus, pro chelataci těžkého kovového atomu, nebo toxin, jako například ricin, kovalentní můstkovou strukturou. Nebo může být použita technologie rekombinantní DNA pro produkci protilátkové molekuly, kdy Fc fragment (CH2, CH3 a kloubové domény), CH2 a CH3 domény nebo CH3 doména kompletní molekuly imunoglobulinu jsou (byly) nahrazeny nebo byly připojeny peptidovou vazbou, k funkčnímu neimunoglobulinovému proteinu, jako například k molekule enzymu nebo toxinu.

45 Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu má výhodně vazebnou afinitu alespoň $0,85 \times 10^{-10}$ M, výhodněji alespoň $0,75 \times 10^{-10}$ M a nejvýhodněji alespoň $0,5 \times 10^{-10}$ M. Je nutné poznamenat, že výhodná humanizovaná protilátková molekula podle předkládaného vynálezu, jak je popsáno níže, má afinitu přibližně $0,5 \times 10^{-10}$ M, což je lepší než afinita myší monoklonální 50 protilátky, ze které pochází. Myší protilátka má afinitu přibližně $0,85 \times 10^{-10}$ M.)

55 Ve výhodném provedení obsahuje protilátková molekula podle předkládaného vynálezu variabilní doménu lehkého řetězce hTNF40-gL1 (SEKV. ID. Č. 8) a variabilní doménu těžkého řetězce gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11). Sekvence variabilní domény těchto lehkých a těžkých řetězců jsou ukázaný na obrázku 8 a 11, v daném pořadí.

Předkládaný vynález rovněž zahrnuje varianty protilátkových molekul podle předkládaného vynálezu, které mají zlepšenou afinitu pro TNF α . Tyto varianty mohou být získány pomocí velkého počtu postupů afinitního zrání (afinitní maturace) včetně mutací CDR (Yang a kol., *J. Mol. Biol.*, 254, 392–403, 1995), „shuffing“ řetězce (Marks a kol., *Bio/Technology*, 10, 779–783, 1992), použití mutátorového kmen *E. coli* (Low a kol., *J. Mol. Biol.*, 250, 359–368, 1996), DNA „shuffing“ (Patten a kol., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724–733, 1997), vystavování na fágu, fágový displej (Thompson a kol., *J. Mol. Biol.*, 256, 77–88, 1996) a „sexual“ PCR (Cramer a kol., *Nature*, 391, 288–291, 1998). Vaughan a kol. (viz výše) pojednávají o těchto metodách afinitní maturace.

Předkládaný vynález také poskytuje DNA sekvence kódující těžké a/nebo lehké řetězce(řetězec) protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu.

Výhodně DNA sekvence kóduje těžký nebo lehký řetězec protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu.

Podle jednoho z výhodných provedení DNA sekvence kóduje lehký řetězec a obsahuje sekvence ukázané v SEKV. ID. Č. 8 (hTNF40–gL1) nebo SEKV. ID. Č. 9 (h–TNF40–gL2) nebo jejich degenerované ekvivalenty.

V alternativním výhodném provedení DNA sekvence kóduje těžký řetězec a obsahuje sekvence ukázané v SEKV. ID. Č. 10 (ghlTNF40.4) nebo SEKV. ID. Č. 11 (gh3hTNF40.4) nebo jejich degenerované ekvivalenty.

DNA sekvence podle předkládaného vynálezu může obsahovat syntetickou DNA, například vytvořenou chemickými postupy, cDNA, genomovou DNA nebo jakoukoliv jejich kombinaci.

Předkládaný vynález se také týká klonovacího nebo expresního vektoru obsahujícího jednu nebo více DNA sekvencí podle předkládaného vynálezu. Výhodně, klonovací nebo expresní vektor obsahuje dvě DNA sekvence, kódující lehký řetězec a těžký řetězec protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu, v daném pořadí.

Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález *E. coli* expresní vektor obsahující DNA sekvenci podle předkládaného vynálezu. Výhodně expresní vektor je pTTO(CDP870), jak je schematicky ukázán na obrázku 22.

Předkládaný vynález také obsahuje vektor pDNABEng–G1, jak je ukázán na obrázku 19.

Obecné metody, kterými mohou být vektory konstruovány, transfekční metody a kultivační metody jsou odborníkům dobře známy. V tomto ohledu je možno odkázat na publikaci „*Current Protocols in Molecular Biology*“, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York a *Maniatis Manual* vydaný nakladatelstvím Cold Spring Harbor Publishing.

DNA sekvence, které kódují protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu mohou být získány metodami, které jsou odborníkům pracujícím v daném oboru běžně známy. Například, DNA sekvence kódující část nebo celý protilátkový těžký a lehký řetězec mohou být syntetizovány dle přání ze zjištěných DNA sekvencí nebo na základě odpovídajících aminokyselinových sekvencí.

DNA kódující sekvence příjemcovského (akceptorového) rámce je odborníkům široce dostupná a může být snadno syntetizována na základě svých známých aminokyselinových sekvencí.

Pro přípravu DNA sekvencí kódujících protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu mohou být použity standardní techniky molekulární biologie. Požadované DNA sekvence mohou

být syntetizovány kompletně nebo částečně s použitím technik syntézy pomocí oligonukleotidů. Vhodně mohou být použity techniky místně cílené mutagenese a polymerázové řetězové reakce (PCR).

5 Pro expresi DNA sekvence kódující protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu může být použit každý vhodný systém hostitelská buňka/vektor. Může být použit bakteriální systém, například *E. coli*, a další mikrobiální systémy, částečně, pro expresi protilátkových fragmentů, jako jsou například Fab a F(ab')₂ fragmenty a zejména Fv fragmenty a fragmenty protilátky s jedním řetězcem, například, jednořetězcové Fvs. Eukaryotické, například savčí, hostitelské buněčné expresní systémy mohou být použity pro produkci větších protilátkových molekul, včetně kompletních protilátkových molekul. Vhodné savčí hostitelské buňky zahrnují CHO buňky, myelomové nebo hybridomové buňky.

15 Předkládaný vynález také poskytuje způsob výroby protilátkových molekul podle předkládaného vynálezu obsahující kultivaci hostitelských buněk obsahujících vektor podle předkládaného vynálezu za podmínek vhodných a vedoucích k expresi proteinu z DNA kódující protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu a izolaci protilátkové molekuly.

20 Výhodně způsob výroby protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu zahrnuje pěstování *E. coli* obsahující *E. coli* expresní vektor obsahující DNA sekvenci podle předkládaného vynálezu za podmínek vhodných a vedoucích k expresi proteinu a izolaci protilátkové molekuly. Protilátková molekula může být sekretována z buněk nebo cílena do periplazmy vhodnými signálními sekvencemi. Nebo se protilátková molekula může akumulovat v cytoplazmě buňky. Výhodně je protilátková molekula cílena do periplazmy. V závislosti na vytvářené protilátkové molekule a použitím postupu, je žádoucí, aby se protilátková molekula správně prostorově složila („refold“) a přijala funkční konformaci. Postupy umožňující protilátkové molekule, aby se složila, jsou odborníkům dobře známé.

30 Protilátková molekula může obsahovat pouze polypeptid těžkého nebo lehkého řetězce, v tomto případě je zapotřebí použít pouze kódující sekvenci těžkého řetězce nebo lehkého řetězce polypeptidu pro transfekci hostitelských buněk. Pro výrobu produktů obsahujících oba těžké a lehké řetězce, může být buněčná linie transfekována dvěma vektory, první vektor kódující polypeptid lehkého řetězce a druhý vektor kódující polypeptid těžkého řetězce. Nebo může být použit jeden vektor, který zahrnuje sekvence kódující polypeptidy lehkého řetězce a těžkého řetězce.

35 Předkládaný vynález také poskytuje terapeutický nebo diagnostický přípravek obsahující protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelným excipientem, ředidlem nebo nosičem.

40 Pokud se týče způsobu výroby tohoto terapeutického nebo diagnostického přípravku, tento postup zahrnuje smísení protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným excipientem, ředidlem nebo nosičem.

45 Protilátková molekula může být jediná aktivní složka v terapeutickém nebo diagnostickém přípravku nebo může být doprovázena další aktivní složkou včetně dalších protilátkových složek, například protilátek anti-T lymfocyt, anti-IFN γ nebo anti-LP nebo neprotilátkových složek, jako jsou například xantiny.

50 Farmaceutické přípravky výhodně obsahují terapeuticky účinné množství protilátky podle vynálezu. Termín „terapeuticky účinné množství“, použitý v tomto textu, se vztahuje k množství terapeutického činidla potřebného k léčbě, zmírnění nebo prevenci cílové nemoci nebo stavu nebo k projevení detekovatelného terapeutického nebo preventivního účinku. Pro každou protilátku může být terapeuticky účinná dávka stanovena nejprve buď v testech na tkáňových kulturách nebo ve zvířecích modelech, obvykle na hlodavcích, králících, psech, prasatech nebo primátech. Zvířecí model může být také použit pro stanovení příslušného rozmezí koncentrace a

způsobu podávání. Tyto informace pak mohou být použity pro stanovení použitelné dávky a způsobu podávání u lidí.

5 Přesné účinné množství pro lidského pacienta závisí na závažnosti chorobného stavu, všeobecném zdraví pacienta, věku, hmotnosti a pohlaví pacienta, stravě, době a četnosti podávání, kombinaci léků reakční citlivosti a toleranci/reakci na léčbu. Toto množství může být stanoveno rutinním experimentováním a závisí na úsudku lékaře. Obecně se účinná dávka pohybuje v rozmezí od 0,01 mg/kg do 50 mg/kg, výhodně 0,1 mg/kg až 20 mg/kg, výhodněji přibližně 15 mg/kg. Jak je ukázáno v příkladu níže, dávky 1,5 a 20 mg/kg byly použity pro léčení pacientů 10 trpících revmatoidní artritidou.

Přípravky mohou být podávány pacientovi samostatně nebo mohou být podávány v kombinaci s dalšími činidly, léčivy nebo hormony.

15 Dávka, ve které jsou protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu podávány, závisí na povaze léčeného chorobného stavu, na stupni, do kterého vystoupila nebo se očekává, že vystoupila, hladina TNF α , která má být neutralizována, nad požadovanou úroveň, a na tom, zda protilátková molekula bude použita profylakticky nebo k léčení již existujícího chorobného stavu.

20 Tak například, jestliže je produkt určen pro léčení nebo profylaxi chronického zánětlivého onemocnění, jako je například revmatoidní artritida, pohybuje se vhodná dávka protilátkové molekula podle předkládaného vynálezu v rozmezí mezi 0,5 a 50 mg/kg, výhodněji mezi 1 a 20 mg/kg a nejvýhodněji je přibližně 15 mg/kg. Častost podávání dávky závisí na biologickém poločase protilátkové molekuly a trvání účinku.

25 Jestliže má protilátková molekula krátký biologický poločas (například 2 až 10 hodin) může být nezbytné podávat jednu nebo více dávek denně. Nebo, jestliže má protilátková molekula dlouhý biologický poločas (například 2 až 15 dnů) může být nutné podávat dávku pouze jednou denně, týdně nebo dokonce jednou za 1 nebo 2 měsíce.

30 Farmaceutický přípravek může také obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič pro podávání protilátky. Nosič sám by neměl indukovat produkci protilátek škodlivých pro jedince, který dostává přípravek, a neměl by být toxický. Vhodné nosiče jsou velké, pomalu metabolizované makromolekuly, jako jsou například proteiny, polypeptidy, liposomy, polysacharidy, polymléčné kyseliny, polyglykolové kyseliny, polymerní aminokyseliny, aminokyselinové kopolymery 35 a inaktivní virové částice.

Rovněž je možno použít farmaceuticky přijatelné soli, například soli minerálních kyselin, jako jsou například hydrochloridy, hydrobromidy, fosfáty a sulfáty nebo soli organických kyselin, 40 jako jsou například acetáty, propionáty, malonáty a benzoáty.

Farmaceuticky přijatelné nosiče v terapeutických přípravcích mohou dále obsahovat tekutiny, jako je například voda, fyziologický roztok, glycerol a ethanol. V těchto přípravcích mohou být dále přítomny pomocné látky, jako jsou například smáčedla nebo emulgátory nebo pH pufrů. 45 Tyto nosiče umožňují, že farmaceutické přípravky jsou formulovány jako tablety, pilulky, dražé, tobolky, tekutiny, gely, sirupy, směsi a suspenze, pro požití pacientem.

Výhodné formy pro podávání zahrnují formy vhodné pro parenterální podávání, například injekci nebo infúzi, například bolusovou injekcí nebo kontinuální infúzi. Když je produkt určen pro 50 injekci nebo infúzi, může mít formu suspenze, roztoku nebo emulze v olejovitém nebo vodném vehikulu a může obsahovat formulační činidla, jako jsou například suspenzační činidla, konzervační činidla, stabilizační a/nebo dispergační činidla. Nebo může být protilátková molekula v suché formě pro rekonstituci před použitím s vhodnou sterilní tekutinou.

Jakmile jsou jednou formulovány, mohou být podávány přípravky podle vynálezu přímo pacientovi. Léčení pacienti mohou být zvířata. Ale je výhodné, když jsou přípravky upraveny pro podávání lidským pacientům.

5 Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu mohou být podávány celou řadou způsobů včetně, aniž by tím byl rozsah nějak omezován, perorálního, intravenózního, intramuskulárního, intraarteriálního, intramedulárního, intrathekálního, intraventrikulárního, transdermálního, transkutánního (viz například, WO 98/20734), subkutánního, intraperitoneálního, intranazálního, enterálního, topického, sublingválního, intravaginálního nebo rektálního způsobu. Spreje mohou
10 také být použity pro podávání farmaceutických přípravků podle vynálezu. Terapeutické přípravky mohou být typicky připraveny jako přípravky pro injekce, a to buď jako tekuté roztoky nebo suspenze. Mohou být také připraveny pevné látkové formy vhodné pro přípravu roztoku nebo suspenze v tekutém vehikulu před injekcí.

15 Přímá aplikace přípravku je obecně uskutečňována injekcí, subkutánní, intraperitoneální, intravenózní nebo intramuskulární nebo aplikací do intersticia tkání. Přípravek může také být podáván na léze. Dávkování léčby může být jednou dávkou nebo podle rozpisu několika dávek.

V této souvislosti je třeba uvést, že aktivní složka v přípravku je protilátková molekula. Jako
20 taková podléhá degradaci v gastrointestinálním traktu. Tedy, jestliže přípravek má být podáván způsobem používajícím gastrointestinální trakt, je zapotřebí, aby přípravek obsahoval činidla, která chrání protilátku před degradací, ale která protilátku po absorbování uvolní z gastrointestinálního traktu.

25 Podrobná diskuse o farmaceuticky přijatelných nosičích je k dispozici v publikaci *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

Předpokládá se také, že protilátka podle předkládaného vynálezu bude podávána s použitím
30 genové terapie. Aby se toho dosáhlo, jsou DNA sekvence kódující těžké a lehké řetězce protilátkové molekuly pod kontrolou příslušných DNA složek zavedeny pacientovi, takže protilátkové řetězce jsou exprimovány z DNA sekvence a sestaveny *in situ*.

Předkládaný vynález také poskytuje protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu pro
35 použití v terapii, to znamená k léčení nemocí zprostředkovaných TNF α .

Předkládaný vynález dále poskytuje použití protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu
40 pro výrobu léčiva pro léčení nemocí zprostředkovaných TNF α .

Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může být použita pro jakoukoliv léčbu, kde
45 je žádoucí, aby se snížil stupeň biologicky aktivního TNF α vyskytujícího se v lidském nebo zvířecím organismu. TNF α může cirkulovat v organismu nebo se může vyskytovat v nežádoucím vysokém stupni lokalizovaný v konkrétním místě v organismu.

Například je zvýšená hladina TNF α zapojena do akutních a chronických imunitních a imuno-
50 regulačních poruch, infekcí včetně septického, endotoxického a kardiovaskulárního šoku, zánětlivých onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, maligních nemocí a hepatitidy indukované alkoholem. Detaily o početných chorobách spojených se zvýšenou hladinou TNF α jsou uvedeny v patentu Spojených států amerických č. US-A-5 919 452. Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může/mohou být použita pro léčbu nemocí zprostředkovaných TNF α .
55 Konkrétní relevantní nemoci, které mohou být léčeny protilátkovou molekulou podle předkládaného vynálezu, jsou sepse, městnavé srdeční selhání, septický nebo endotoxický šok, kachexie, syndrom respirační tísně dospělých, AIDS, alergie, psoriasis, TBC, zánětlivá kostní onemocnění, poruchy krevní koagulace, popáleniny, rejekce po transplantaci orgánů nebo tkání, Crohnova nemoc a autoimunitní onemocnění, jako je například tyreoiditida a revmatoidní artritida a osteoartritida.

5 Protilátková molekula nebo přípravek mohou být dále použity: ke snížení vedlejších účinků sdružených s tvořením TNF α v průběhu terapie neoplastických onemocnění, k odstranění nebo snížení symptomů šoku spojených s léčením nebo prevencí rejekce štěpu při použití anti-lymfocytárních protilátek, nebo k léčení multiorgánového selhání.

Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu se výhodně použije pro léčení revmatoidní artritidy nebo osteoartritidy.

10 Pokud se týče způsobu léčení humánních nebo zvířecích pacientů, kteří trpí nebo jsou v riziku onemocnění zprostředkovaného TNF α , potom tento postup zahrnuje podávání pacientovi účinného množství protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu.

15 Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může také být použita pro diagnózu, například pro *in vivo* diagnózu a znázornění chorobného stavu se zvýšenou hladinou TNF α .

20 Předkládaný vynález také poskytuje protilátkovou molekulu obsahující hybridní CDR obsahující zkrácené dárcovské CDR sekvence, kde chybějící část zkráceného dárcovského CDR je nahrazena odlišnou sekvencí a tvoří funkční CDR. Termín „hybridní CDR“, používaný v tomto textu, znamená CDR obsahující dárcovský CDR, který byl zkrácen v jedné nebo více polohách, například na jednom nebo obou koncích, chybějící část zkráceného dárcovského CDR je nahrazena odlišnou sekvencí a tvoří kompletní a funkční CDR. Hybridní CDR má alespoň jednu aminokyselinovou změnu ve srovnání s kompletním dárcovským CDR. Sekvence nahrazující zkrácenou část CDR může být jakákoliv sekvence. Výhodně nedárcovská část CDR sekvence je z protilátky, ze které pocházejí úseky rámce protilátkové molekuly, jako je například protilátková sekvence zárodeční linie.

30 Podle předmětného vynálezu bylo zjištěno, že protilátkové molekuly obsahující hybridní CDR si podržely v podstatě stejnou vazebnou afinitu jako protilátková molekula obsahující kompletní dárcovské CDR. Termín „v podstatě stejná vazebná afinita“, používaný v tomto textu znamená alespoň 70 %, výhodněji alespoň 85 % a nejméně výhodněji alespoň 95 % vazebné afinity odpovídající protilátkové molekule obsahující kompletní dárcovské CDR. Jak uvedeno výše, v určitých případech může být afinita protilátky podle vynálezu větší než afinita dárcovské protilátky. Použití hybridní CDR poskytuje výhodu redukce množství cizorodé (tj. dárcovské) sekvence vyskytující se v protilátkové molekule a může zvýšit vazebnou afinitu protilátkové molekuly ve srovnání s odpovídající protilátkovou molekulou obsahující kompletní dárcovské CDR.

40 Každý CDR protilátkové molekuly může být hybridní. V protilátkové molekule je výhodně hybridní CDR2 těžkého řetězce.

Výhodné je zkrácení dárcovského CDR o 1 až 8 aminokyselin, výhodněji o 4 až 6 aminokyselin. Je dále výhodné, když je zkrácení provedeno v C-koncové části CDR.

45 V závislosti na sekvenci zkrácené části CDR a sekvenci odlišné sekvence nahrazující chybějící část může být vytvořen velký počet aminokyselinových změn. Výhodně jsou vytvořeny alespoň 2 aminokyselinové změny, výhodněji jsou vytvořeny alespoň 3 aminokyselinové změny a nejméně výhodněji jsou vytvořeny alespoň 4 aminokyselinové změny.

50 Konkrétním provedením tohoto aspektu vynálezu je protilátka podle prvního aspektu vynálezu, kde druhý CDR v těžkém řetězci má sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 2. Ta má lepší afinitu pro svůj antigen, než dárcovská protilátka, ze které pochází část CDR.

Předkládaný vynález také poskytuje sekvenci nukleové kyseliny, která kóduje protilátkovou molekulu obsahující hybridní CDR podle předkládaného vynálezu.

55

Předkládaný vynález také poskytuje expresní vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny kódující protilátkovou molekulu obsahující hybridní CDR podle předkládaného vynálezu.

5 Předkládaný vynález také poskytuje hostitelskou buňku transformovanou vektorem podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález také poskytuje způsob výroby protilátkové molekuly obsahující hybridní CDR zahrnující kultivaci hostitelské buňky podle předkládaného vynálezu a izolaci protilátkové molekuly.

10

Popis přiložených obrázků

15 Předkládaný vynález je pro ilustraci dále popsán v následujících příkladech, které se vztahují k přiloženým obrázkům, přičemž na těchto obrázcích:

Obrázek 1 ukazuje úseky rámce podskupiny 1 humánních lehkých řetězců ve srovnání s úseky rámce hTNF40 lehkého řetězce (SEKY. ID. Č. 83 až 90).

20 Obrázek 2 ukazuje úseky rámce podskupiny 1 a podskupiny 3 humánních těžkých řetězců ve srovnání s úseky rámce hTNF40 těžkého řetězce (SEKV. ID. Č. 91 až 98 a 106 až 109).

Obrázek 3 ukazuje aminokyselinovou sekvenci CDR z hTNF40 (SEKV. ID. Č. 1 až 7), kde CDR H2' je hybridní CDR, kde šest aminokyselin z C-koncové části je z H2 CDR sekvence humánní podskupiny 3 protilátky zárodečné linie a aminokyselinové změny sekvence plynoucí z této hybridizace jsou podtrženy.

Obrázek 4 ukazuje vektor pMR15.1.

Obrázek 5 ukazuje vektor pMR14.

30 Obrázek 6 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci myší hTNF40V1 (SEKV. ID. Č. 99).

Obrázek 7 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci myší hTNF40Vh (SEKV. ID. Č. 100).

Obrázek 8 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci hTNF40-gL1 (SEKV. ID. Č. 8).

35 Obrázek 9 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci hTNF40-gL2 (SEKV. ID. Č. 9).

Obrázek 10 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci gh1hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 10).

40 Obrázek 11 ukazuje nukleotidovou a předpovězenou aminokyselinovou sekvenci gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11).

Obrázek 12 ukazuje vektor CTIL5-gL6.

Obrázek 13 ukazuje strukturu sloučeniny nazvané CDP870 obsahující modifikovaný Fab fragment pocházející z protilátky hTNF40 kovalentně spojený prostřednictvím cysteinového zbytku k lysyl-maleimidové spojce, kde každá aminoskupina na lisylovém zbytku má k sobě kovalentně připojen methoxy-PEG zbytek, přičemž n je přibližně 420.

Obrázek 14 ukazuje vektor pTTQ9.

Obrázek 15 ukazuje sekvence OmpA oligonukleotidového adaptéru (SEKV. ID. C. 101).

Obrázek 16 ukazuje vektor pACYC184.

- Obrázek 17 ukazuje vektor pTTO-1.
 Obrázek 18 ukazuje vektor pTTO-2.
 Obrázek 19 ukazuje vektor pDNA_{Eng}-G1.
- 5 Obrázek 20 ukazuje oligonukleotidové kazety kódující odlišné intergenové sekvence pro expresi modifikovaného Fab v *E. coli* (SEKV. ID. Č 102 až 105).
- Obrázek 21 ukazuje akumulaci modifikovaného Fab IGS variant v periplazmě.
 Obrázek 22 ukazuje vektor PTTO (CDP870)
- 10 Obrázek 23 ukazuje skóre aktivity nemoci (DAS) u pacientů léčených odlišnými dávkami CDP870 a placebo. Medián a IQ rozmezí jsou uvedeny pro populaci pro každý postup s posledními pokračujícími pozorováními. Malé čtverečky označují placebo, kosočtverce označují 1 mg/kg, trojúhelníky označují 5 mg/kg a velké čtverce označují 20 mg/kg.
- 15 Obrázek 24 ukazuje četnost výskytu citlivých kloubů, četnost výskytu oteklých kloubů, skóre bolesti, celkový odhad aktivity nemoci stanovený odhadcem, modifikovaný dotazník k vyhodnocení zdravotního stavu (HAQ), C reaktivní protein (CRP) a rychlost sedimentace červených krvinek (ESR) u pacientů léčených odlišnou dávkou CDP870 a placebem. Medián a IQ rozmezí jsou uvedeny pro populaci pro každý postup s posledními pokračujícími pozorováními. Malé čtverečky označují placebo, kosočtverce označují 1 mg/kg, trojúhelníky označují 5 mg/kg a velké čtverce označují 20 mg/kg.
- 20 Obrázek 24 ukazuje četnost výskytu citlivých kloubů, četnost výskytu oteklých kloubů, skóre bolesti, celkový odhad aktivity nemoci stanovený odhadcem, modifikovaný dotazník k vyhodnocení zdravotního stavu (HAQ), C reaktivní protein (CRP) a rychlost sedimentace červených krvinek (ESR) u pacientů léčených odlišnou dávkou CDP870 a placebem. Medián a IQ rozmezí jsou uvedeny pro populaci pro každý postup s posledními pokračujícími pozorováními. Malé čtverečky označují placebo, kosočtverce označují 1 mg/kg, trojúhelníky označují 5 mg/kg a velké čtverce označují 20 mg/kg.

Příklady provedení vynálezu

25

Klonování genu a exprese chimérické hTNF40 protilátkové molekuly

Izolace RNA z hTNF40 hybridomových buněk

- 30 Celková RNA byla připravena z 3×10^7 hTNF40 hybridomových buněk takto. Buňky byly promyty ve fyziologickém roztoku a rozpuštěny v RNazolu (0,2 ml na 10^6 buněk). Byl přidán chloroform (0,2 ml na 2 ml homogenátu) a směs byla důkladně třepána po dobu 15 sekund, a poté ponechána na ledu po dobu 15 minut. Výsledná vodná a organická fáze byly odděleny centrifugací po dobu 15 minut v Eppendorfově centrifuze a RNA byla precipitována z vodné fáze
- 35 přidáním stejného objemu isopropanolu. Po 15 minutách na ledu byla RNA stočena do peletu, promyta 70% ethanolem, usušena a rozpuštěna ve sterilní vodě bez RNázy. Výtěžek RNA byl 400 µg.

PCR klonování hTNF40 Vh a V1

40

cDNA sekvence kódující variabilní domény hTNF40 těžkého a lehkého řetězce byly syntetizovány s použitím reverzní transkriptázy za vzniku jednovláknových cDNA kopií mRNA přítomné v celkové RNA, pak následovala polymerázová řetězová reakce (PCR) na cDNA se specifickými oligonukleotidovými primery.

45

a) syntéza cDNA

- cDNA byla syntetizována v reakční směsi o objemu 20 µl obsahující následující reagenty: 50mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 20 jednotek RNAsinu, 75 ng náhodných hexanukleotidových primerů, 2 µg hTNF40 RNA a 200 jednotek reverzní transkriptázy z viru MoMuLV (Moloneyovy myši leukémie). Po inkubaci ve 42 °C po dobu 60 minut, reakce byla ukončena zahříváním v 95 °C po dobu 5 minut.
- 50

b) PCR

Alikvoty cDNA byly podrobeny PCR s použitím kombinace primerů specifických pro těžké a lehké řetězce. Nukleotidové sekvence 5' primerů pro těžké a lehké řetězce jsou ukázány v tabulce 1 a 2, v daném pořadí. Tyto sekvence všechny obsahují postupně restriční místo začínající 7 nukleotidů od jejich 5' konců, sekvenci GCCGCCACC (SEKV. ID. Č. 12) pro umožnění optimální translace výsledných mRNA, iniciační kodon a 20–30 nukleotidů založených na vedoucí peptidové sekvenci známých myších protilátek (Kabat a kol., Sequences of proteins of immunological interest, 5. vydání, 1991, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

3' primery jsou ukázány v tabulce 3. Primer lehkého řetězce přesahuje J–C spojení protilátky a obsahuje restriční místo pro enzym Sp1I pro usnadnění klonování V1 PCR fragmentu. 3' primery těžkého řetězce jsou směsí navrženou k přesáhnutí J–C spojení protilátky. 3' primer zahrnuje ApaI restriční místo pro usnadnění klonování. 3' úsek primerů obsahuje smíšenou sekvenci založenou na sekvencích zjištěných ve známých myších protilátkách (Kabat a kol., 1991, výše).

Kombinace primerů popsaných výše umožní PCR produktům pro Vh a V1, že jsou klonovány přímo do vhodného expresního vektoru (viz níže) pro produkci chimérických (myší–humánní) těžkých a lehkých řetězců, a těmto genům, že jsou exprimovány v savčích buňkách k pro produkci chimérických protilátek požadovaného izotypu.

Inkubace (100 μ l) pro PCR byly nastaveny takto. Každá reakce obsahovala 10 mM Tris–HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 10 pmol směsi 5' primerů (tabulka 4), 10 pmol 3' primeru (CL12 (lehký řetězec) nebo R2155 (těžký řetězec) (tabulka 3), 1 μ l cDNA a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly inkubovány v 95 °C po dobu 5 minut a poté podrobeny cyklům v 94 °C po dobu 1 minuty, 55 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byl alikvot z každé reakce analyzován elektroforézou na agarózovém gelu. Reakce pro lehké řetězce obsahující směsi 5' primerů ze skupin pro lehké řetězce 1, 2 a 7 vytvořily pásy o velikostech souhlasných s kompletními V1 fragmenty, zatímco reakce ze skupin pro těžké řetězce 3 vytvořily fragment o velikosti očekávaného Vh genu. Pás vytvořený primery ze skupiny pro lehké řetězce 1 nebyl dále sledován, protože předběžné výsledky ukázaly, že tento pás odpovídá pseudogenu lehkého řetězce tvořeného hybridomovými buňkami. Pás vytvořený primery ze skupiny pro lehké řetězce 7 byl slabší než pás primerů ze skupiny 2, a tudíž nebyl dále sledován. Pouze pás vytvořený primery ze skupiny pro lehké řetězce 2, což byl nejsilnější pás, byl dále sledován.

c) Molekulární klonování PCR fragmentů

DNA fragmenty vytvořené v reakcích s primery ze skupiny pro lehké řetězce 2 byly štěpeny enzymy BstBI a Sp1I, koncentrovány ethanolovou precipitací, podrobeny elektroforéze na 1,4% agarózovém gelu a DNA pásy o velikosti 400 párů bází byly opět získány. Byly klonovány ligací do vektoru pMR15.1 (obrázek 4), který byl štěpen BstBI a Sp1I. Po ligaci byly směsi transformovány do *E. coli* LM 1035 a s plazmidy z výsledných bakteriálních kolonií byl prováděn screening na inzerty pomocí štěpení s BstBI a Sp1I. Reprezentativní vzorky s inzerty z každé ligace byly analyzovány dále prostřednictvím nukleotidového sekvencování.

Podobně byly štěpeny DNA fragmenty vytvořené v reakcích s primery ze skupiny pro těžké řetězce 3 s enzymy HindIII a ApaI a klonovány do vektoru pMR14 (obrázek 5), který byl štěpen HindIII a ApaI. Opět, reprezentativní plazmidy obsahující inzerty byly analyzovány nukleotidovým sekvencováním.

d) Analýza sekvencováním nukleotidů

Plazmidová DNA z velkého počtu izolátů obsahujících Vh inzerty byla sekvencována s použitím primerů R1053 (viz tabulka 5) (které nasedají v 3' úseku HCMV promotoru v pMR14) a R720 (viz tabulka 5) (které nasedají v 5' úseku humánního C – gama 4 a umožňují sekvencování přes DNA inzert v pMR14). Bylo zjištěno, že nukleotidové sekvence Vh inzertu ve velkém počtu klonů byly totožné, s výjimkou rozdílů v signálním peptidu a J úsecích. To ukazovalo, že vyšetřené klony jsou nezávislé izoláty vznikající použitím odlišných primerů ze směsi oligonukleotidů v průběhu PCR stádia. Zjištěné nukleotidové sekvence a předpovězené aminokyselinové sekvence variabilní domény těžkého řetězce protilátky hTNF40 (hTNF40Vh) jsou uvedeny na obrázku 7 (SEKY. ID. Č. 100).

Pro analýzu klonů lehkého řetězce byly vyšetřovány sekvence pocházející z reakcí s primery R1453 (viz tabulka 5) a R684 (SEKV. ID. Č. 62) (které nasedají v 5' úseku humánního C–kappa a umožňují sekvencování přes DNA inzert na pMR15.1). Nukleotidové sekvence a předpovězené aminokyselinové sekvence V1 genů vznikajících z reakcí ve skupině 2 byly analyzovány podobně. Opět bylo zjištěno, že nukleotidové sekvence V1 inzertu ve velkém počtu klonů byly totožné, s výjimkou rozdílů v signálním peptidu a J úsecích, což ukazovalo, že vyšetřené klony byly nezávislé izoláty vznikající použitím odlišných primerů ze směsi oligonukleotidů v průběhu PCR stádia. Zjištěné nukleotidové sekvence a předpovězené aminokyselinové sekvence variabilní domény lehkého řetězce protilátky hTNF40 (hTNF40V1) jsou uvedeny na obrázku 6 (SEKV. ID. Č. 99).

25 Tabulka 1

Oligonukleotidové primery pro 5' úsek myších těžkých řetězců.

CH1: 5' ATGAAATGCAGCTGGGTCAT (G, C) TTCTT3' (SEKV. ID. Č. 13)

CH2: 5' ATGGGATGGAGCT (A, G) TATCAT (C, G) (C, T) TCTT3' (SEKV. ID. Č. 14)

CH3: 5' ATGAAG (A, T) TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (SEKV. ID. Č. 15)

CH4: 5' ATG (G, A) ACTTTGGG (T, C) TCAGCTTG (G, A) T3' (SEKV. ID. Č. 16)

CH5: 5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEKV. ID. Č. 17)

CH6: 5' ATGGCTGTC (C, T) T (G, A) G (G, C) GCT (G, A) CTCTTCTG3' (SEKV. ID. Č. 18)

CH7: 5' ATGG (G, A) ATGGAGC (G, T) GG (G, A) TCTTT (A, C) TCTT3' (SEKV. ID. Č. 19)

CH8: 5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEKV. ID. Č. 20)

CH9: 5' ATGG (C, A) TTGGGTGTGGA (A, C) CTTGCTATT3' (SEKV. ID. Č. 21)

CH10: 5' ATGGGCAGACTTACATTCATTCCT3' (SEKV. ID. Č. 22)

CH11: 5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEKV. ID. Č. 23)

CH12: 5' ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT3' (SEKV. ID. Č. 24)

30 Každý z výše uvedených primerů má ke svému 5' konci přidanou sekvenci 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEKV. ID. Č. 25).

Tabulka 2

Oligonukleotidové příměry pro 5' úsek myších lehkých řetězců.

- CL1: 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEKV. ID. Č. 26)
 CL2: 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEKV. ID. Č. 27)
 CL3: 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEKV. ID. Č. 28)
 CL4: 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEKV. ID. Č. 29)
 CL5: 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEKV. ID. Č. 30)
 CL5A: 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEKV. ID. Č. 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'
 (SEKV. ID. Č. 32)
 CL7: 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEKV. ID. Č. 33)
 CL8:
 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTCAAT3' (SEKV. ID. Č. 34)
 CL9: 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEKV. ID. Č. 35)
 CL10: 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTC3' (SEKV. ID. Č. 36)
 CL11: 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3' (SEKV. ID. Č. 37)
 CL12A: 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3'
 (SEKV. ID. Č. 38)
 CL12B: 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEKV. ID. Č. 39)
 CL13: 5'ATGGATTCACAGGCCAGGTTCT'TAT3' (SEKV. ID. Č. 40)
 CL14: 5'ATGATGAGTCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEKV. ID. Č. 41)
 CL15: 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEKV. ID. Č. 42)
 CL16: 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEKV. ID. Č. 43)
 CL17A: 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEKV. ID. Č. 44)
 CL17B: 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEKV. ID. Č. 45)
 CL17C: 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEKV. ID. Č. 46)

5

Každý z výše uvedených přímerů má ke svému 5' konci přidanou sekvenci 5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEKV. ID. Č. 47).

Tabulka 3

Oligonukleotidové primery pro 3' konce myších Vh a V1 genů.

Lehký řetězec (CL12):

5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEKV. ID. Č. 48)

Těžký řetězec (R2155):

5' GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A, C)(A, G)GAGAC(G, T, A)GTGA3'

5 (SEKV. ID. Č. 49)

Tabulka 4

a) směsi 5' primerů pro lehké řetězce pro PCR reakce

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

b) směsi 5' primerů pro těžké řetězce pro PCR reakce

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

Tabulka 5

25

Primery použité pro analýzu sekvencováním nukleotidů

R1053: 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEKV. ID. Č. 50)

R720: 5'GCTCTCGGAGGTGCTCCT3' (SEKV. ID. Č. 51)

Hodnocení aktivity chimérických genů

30

Aktivita chimérických genů byla hodnocena jejich expresí v savčích buňkách a purifikací a kvantifikací nově syntetizovaných protilátek. Metodologie je popsána níže, následovaná popisem biochemických a buněčných testů použitých pro biologickou charakterizaci protilátek.

a) Produkce chimérické hTNF40 protilátkové molekuly

35

Chimérická protilátka pro biologické hodnocení byla vytvořena pomocí přechodné exprese příslušných párů těžkých a lehkých řetězců po ko-transfekci (společné transfekci) na buňkách z ovaríí čínskému křečka – Chinese Hamster Ovary (CHO) s použitím precipitace fosfátem vápenatým.

40

V den před transfekcí byly baňky s napůl konfluentními buňkami CHO-L761 podrobeny působení trypsinu, buňky byly počítány a do každé baňky T75 bylo vloženo 10^7 buněk.

Příští den bylo kultivační médium změněno 3 hodiny před transfekcí. Pro provádění transfekce byl připraven precipitát fosfátu vápenatého smícháním 1,25 ml 0,25M CaCl_2 obsahujícího 50 μg expresních vektorů s každým těžkým a lehkým řetězcem s 1,25 ml 2 x HBS (16,36 g NaCl, 11,0 g HEPES a 0,4 g Na_2HPO_4 v 1 l vody, pH upraveno na 7,1 pomocí NaOH) a byl okamžitě přidán do média k buňkám. Po 3 hodinách ve 37°C v CO_2 inkubátoru byly médium a precipitát odstraněny a buňky byly podrobeny šoku přidáním 15 ml 15% glycerolu ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS) po dobu 1 minuty. Glycerol byl odstraněn, buňky byly jednou promyty PBS a inkubovány po dobu 48–96 hodin ve 25 ml média obsahujícího 10 mM butyrát sodný. Protilátka byla purifikována z kultivačního média vazbou na protein A–Sepharose a elucí.

b) ELISA

Pro provádění testu ELISA byly destičky Nunc ELISA potaženy přes noc ve 4°C s F(ab)_2 fragmentem anti–humánní polyklonální koží protilátky specifické pro Fc fragment (Jackson Imunovýzkum, kóduj 109–006–098) v 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve vazebném pufru (15 mM uhličitán sodný, 35 mM hydrouhličitán sodný, pH 6,9). Nenavázaná protilátka byla odstraněna promytím 5 krát destilovanou vodou. Vzorky a purifikované standardy, které měly být kvantifikovány, byly naředěny přibližně na 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v konjugačním pufru (0,1 M Tris–HCl, pH 7,0, 0,1 M NaCl, 0,2% (objem/objem) Tween 20, 0,2% (hmotnost/objem) Hammerstenův kasein). Vzorky byly titrovány v mikrotitračních jamkách ve dvojkových ředěních za vzniku konečného objemu 0,1 ml v každé jamce a destičky byly inkubovány při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny s třepáním. Po prvním inkubačním kroku byly destičky promyty 10 krát destilovanou vodou, a poté inkubovány po dobu 1 hodiny jako předtím s 0,1 ml myší anti–humánní kappa monoklonální protilátkou (klon GD12) konjugovanou s peroxidázou (The Binding Site, katalog, č. MP135) v ředění 1 k 700 v konjugačním pufru. Destička byla opět promyta a do každé jamky byl přidán roztok substrátu (0,1 ml). Roztok substrátu obsahoval 150 μl N,N,N,N–tetramethylbenzidin (10 mg/ml v DMSO), 150 μl peroxid vodíku (30% roztok) v 10 ml 0,1 M acetát sodný/ citrát sodný, pH 6,0. Destičky byly vyvolávány po dobu 5–10 minut, dokud nebyla absorbance v 630 nm přibližně 1,0 pro horní standard. Absorbance v 630 nm byla měřena s použitím přístroje pro odečítání mikrotitračních destiček a koncentrace vzorku stanovena srovnáním titrační křivky s křivkou standardu.

35 c) stanovení afinitních konstant analýzou BiaCore

Vazebné interakce mezi hTNF40 a humánním TNF byly zkoumány s použitím technologie BIA. Afinitně purifikovaná koží polyklonální protilátka, namířená proti konstantnímu úseku hTNF40, byla imobilizována na dextranový polymer povrchu sensorického čipu s použitím standardní NHS/EDC chemie. Relativně nízké množství (200–500 RU) hTNF40 bylo zachyceno, aby bylo zajištěno, že byly minimalizovány účinky hmotového transportu. Přes zachycenou hTNF40 „protékal“ humánní TNF v různých koncentracích, aby bylo možné stanovit asociační kinetiku. Po injekci ligandu přecházel přes povrch pufru, aby bylo možné měřit disociaci. Byly vypočteny konstanty rychlosti asociace a disociace pro interakce mezi hTNF40 na pevné fázi a humánním TNF a byla určena hodnota KD.

Příklad 1

50 CDR–roubování hTNF40

Molekulární klonování genů pro variabilní úseky těžkých a lehkých řetězců hTNF40 protilátky a jejich použití pro produkci chimérických (myší–humánní) hTNF40 protilátek bylo popsáno výše. Nukleotidové a aminokyselinové sekvence myších hTNF40 V1 a Vh jsou ukázány na

obrázku 6 a 7 (SEKV. ID. Č. 99 a 100), v daném pořadí. Tyto příklady popisují CDR–roubování hTNF40 protilátky.

CDR–roubování hTNF40 lehkého řetězce

5

Porovnání úseků rámce hTNF40 lehkého řetězce s úseky čtyř podskupin humánních lehkých řetězců (Kabat a kol., 1991, výše) odhalilo, že hTNF40 byla většinou homologní s protilátkami v podskupině humánních lehkých řetězců 1. proto tedy pro konstrukci CDR–roubovaného lehkého řetězce vybrané úseky rámce odpovídaly úsekům kanonické sekvence humánní skupiny 1.

10

Srovnání aminokyselinových sekvencí úseků rámce myši hTNF40 a kanonických lehkých řetězců humánní skupiny 1 je uvedeno na obrázku 1 a ukazuje, že se vyskytuje 22 rozdílů (podtrženo) mezi těmito dvěma sekvencemi. Analýza přínosu, který každý z těchto rozdílů v rámci úseku protilátky může mít na vazbu antigenu, identifikovala 2 zbytky pro výzkum, byly v polohách 46 a 60. Na základě této analýzy byly konstruovány dvě verze CDR–roubovaného lehkého řetěz. V první z nich, hTNF40–gL1 (SEKV. ID. Č. 8), zbytky 46 a 60 pocházejí z hTNF40 lehkého řetěz, zatímco ve druhé, hTNF40–gL2 (SEKV. ID. Č. 9), všechny zbytky jsou humánní kanonické kromě zbytku č. 60, který je z hTNF40 lehkého řetězce.

15

20

Konstrukce CDR–roubovaného lehkého řetězce hTNF40–gL1

Konstrukce hTNF40–gL1 je detailně uvedena níže. Následující překrývající se oligonukleotidy (P7982–P7986) byly použity v polymerázových řetězových reakcích (PCR) k sestavení zkráceného roubovaného lehkého řetězce. Sestavený fragment postrádá protilátkovou vedoucí sekvenci a prvních 17 aminokyselin rámce 1.

25

oligo 1 P7982:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTAATAAC
GTAGCCTGGTATCAGCAA3' (SEKV. ID. Č. 52)

oligo 2 P7983:

5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTGGGGCTTTACCTGGTTT
TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEKV. ID. Č. 53)

oligo 3 P7984:

5' TACAGTGCCCTTTTCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTTACGCGGATCCG
GTAGTGGTACTGATTTTAC3' (SEKV. ID. Č. 54)

oligo 4 P7985:

5' GACAGTAATA,AGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGATCGTGAGGGT
GAAATCAGTACCACTACCG3' (SEKV. ID. Č. 55)

oligo 5 P7986:

5' ATTTCCGCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCGGT
CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEKV. ID. Č. 56)

Fwd P7981:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (SEKV. ID. Č. 57)

Bwd P7980

5' GAATTCCGTACGTTTGATTCTACTTTAGT3' (SEKV. ID. Č. 58),

PCR reakce v objemu 100 μ l obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 pmol P7980, P7981 a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94 °C po dobu 1 minuty, 55 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla každá reakce analyzována elektroforézou na agarózovém gelu a PCR fragment byl z gelu vyříznut a znovu získán s použitím soupravy Mermaid Kit. Získaný fragment byl štěpen enzymy BstEII a SpII v příslušném pufru. Výsledný produkt byl nakonec podroben elektroforéze na agarózovém gelu a z gelového řezu byl opět získán DNA fragment o velikosti 270 párů bází a byl ligován do vektoru CTIL5-gL6 (obrázek 12), který byl dříve štěpen stejným enzymem. Výše uvedený vektor poskytuje chybějící protilátkovou vedoucí sekvenci a prvních 17 aminokyselin rámce 1.

Ligační směs byla použita pro transformaci kmene LM1035 *E. coli* a výsledné kolonie byly analyzována pomocí PCR, štěpením restrikcími enzymy a nukleotidovým sekvencováním. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence V1 úseku hTNF40-gL1 je ukázána na obrázku 8 (SEKV. ID. Č. 8).

Konstrukce CDR-roubovaného lehkého řetězce hTNF40-gL2

hTNF40-gL2 (SEKV. ID. Č. 9) byl konstruován s použitím PCR. Pro zavedení aminokyselinových změn byly použity následující oligonukleotidy:

R 1053: 5' GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEKV. ID. Č. 59)

R5350: 5'TCTAGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTGATGCAGCATAGAT
CAGGAGCTTAGGAGC3' (SEKV. ID. Č. 60)

R5349: 5'GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTCAGTGGCAGTGGATCA
GGCACAGACTTTACCCTAAC3' (SEKV. ID. Č. 61)

R684: 5'TTCAACTGCTCATCAGAT3' (SEKV. ID. Č. 62)

Dvě reakce, každá po 20 μ l, obsahovaly po 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 0,1 μ g hTNF40-gL1, 6 pmol R1053/R5350 nebo R5349/R684 a 0,25 jednotky Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94 °C po dobu 1 minuty, 55 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu

1 minuty. Po 30 cyklech byla každá reakce analyzována elektroforézou na agarózovém gelu a PCR fragment byl z gelu vyříznut a znovu získán s použitím soupravy Mermaid Kit.

5 Alikvoty těchto reakcí byly poté podrobeny druhému kolu PCR. Reakce 100 μ l obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % (hmotnost/objem) želatiny, 1/5 každého PCR fragmentu z první sady reakcí, 30 pmol R1053 a R684 a 2,5 jednotky Taq polymerázy. Reakční teploty byly uvedeny výše. Po PCR byla směs extrahována směsí fenolu a chloroformu, a poté chloroformem a precipitována ethanolem. Ethanolový precipitát byl znovu 10 získán centrifugací, rozpuštěn v příslušném pufru a štěpen enzymy BstEII a SplI. Výsledný produkt byl nakonec podroben elektroforéze na agarózovém gelu a z gólového řezu byl opět získán DNA fragment o velikosti 20 párů bází a byl ligován do vektoru pMR15.1 (obrázek 4), který byl dříve štěpen stejným enzymem.

15 Ligační směs byla použita pro transformaci kmene LM1035 *E. coli* a výsledné kolonie byly analyzovány pomocí PCR, štěpením restriktivními enzymy a nukleotidovým sekvencováním. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence V1 úsek hTNF40-g1L2 je ukázána na obrázku 9 (SEKV. ID. Č. 9).

CDR-roubování hTNF40 těžkého řetězce

20 CDR-roubování hTNF40 těžkého řetězce bylo uskutečněno s použitím stejné strategie, jak byla popsána pro lehké řetězce. Bylo zjištěno, že hTNF40 těžkého řetězce je většinou homologní s humánními těžkými řetězci patřícími k podskupině 1, a tudíž kanonická sekvence čtecích rámců humánní podskupiny 1 byl vybrán pro přijetí CDR z hTNF40 těžkého řetězce.

25 Pro zkoumání podmínek, aby homologní humánní rámec fungoval jako příjemcovský rámec pro CDR roubování, byl vybrán druhý rámec z humánní skupiny 3 pro humanizaci hTNF40 těžkého řetězce.

30 Srovnání hTNF40 se dvěma odlišnými úseky rámce je ukázáno na obrázku 2, kde je možné vidět, že hTNF40 se liší od kanonické humánní podskupiny 1 v poloze 32 (podtrženo) a od kanonické humánní podskupiny 3 se liší v poloze 40 (podtrženo). Po analýze příspěvku k tomu, že každý z nich může vázat antigen, byly zbytky 28, 38, 46, 67, 69 a 71 zachovány jako dárcovské v CDR-roubovaném těžkém řetězci gh1hTNF40.1, s použitím rámce skupiny 1. Zbytky 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 a 78 byly zachovány jako dárcovské v CDR-roubovaném těžkém řetězci, gh3hTNF40.4, s použitím rámce skupiny 3. Zbytky 28, 69 a 71 byly udrženy jako 35 dárcovské v CDR-roubovaném těžkém řetězci, gh1hTNF40.4 s použitím rámce skupiny 1.

Konstrukce CDR-roubovaného těžkého řetězce gh1hTNF40.4

40 gh1hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 1,0) byla sestavena pomocí překrývajících se oligonukleotidů metodou PCR v přítomnosti příslušných primerů. V PCR byly použity následující oligonukleotidy:

Roub skupiny 1

oligo 1 P7989:

5' GAAGCACCAGGCTTCTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG
AGTGCACGAATTC3' (SEKV. ID. Č. 63)

oligo 2 P7990:

5' GGTTAAGAAGCCTGGTGTCTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC
GTGTTACAGACTATGGTA3' (SEKV. ID. Č. 64)

oligo 3 P7991:

5' CCAACCCATCCATTTTCAGGCCTTGTCCCGGGCCCTGCTTGACCCAATTCATAC
CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEKV. ID. Č. 65)

oligo 4 P7995:

5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEKV. ID. Č. 66)

oligo 5 P7992:

5' CCATGTATGCAGTGCCTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTTGAA3'
(SEKV. ID. Č. 67)

oligo 6 P7993:

5' CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCCG
AGTGTACTAT3' (SEKV. ID. Č. 68)

oligo 7 P7994:

5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEKV. ID. Č. 69)

Fwd: P7988:

5' GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGC'TGGTC3' (SEKV. ID. Č. 70)

Bwd P7987: 5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEKV. ID. Č.
71)

100 µl reakce obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01%
(hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol každého z
5 p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 a p7994, 10 pmol každého z p7988 a p7987 a 1
jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94 °C po dobu 1 minuty, 55 °C po
dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla reakce extrahována směsí fenolu a
chloroformu (1/1), poté chloroformem a precipitována ethanolem. Po centrifugaci byla DNA
rozpuštěna v příslušném restričním pufru a štěpena ApaI a KpnI. Výsledný fragment byl
10 izolován z agarózového gelu a ligován do pMR14 (obrázek 5), který byl dříve štěpen stejným
enzymem. pMR14 obsahují humánní gama 4 konstantní úseky těžkého řetězce. Když pMR14 je
štěpen ApaI a KpnI, naštěpený vektor je schopný přijmout štěpenou DNA tak, že 3' konec
štěpené DNA se ve čtecím rámci spojí s 5' koncem sekvence kódující konstantní úsek gama 4.
15 Tudíž těžký řetězec exprimovaný tímto vektorem má izotyp gama 4. Ligační směs byla použita
pro transformaci *E. coli* LM1035 a výsledné bakteriální kolonie byly podrobeny screeningu
restričním štěpením a analýze nukleotidovým sekvencováním. Takto byl identifikován plazmid
obsahující správnou sekvenci pro gh1hTNF40.4 (obrázek 10) (SEKV. ID. Č. 10).

Konstrukce CDR-roubovaného těžkého řetězce gh3hTNF40.4

gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11) byla sestavena podrobením překrývajících se oligonukleotidů metodou PCR v přítomnosti příslušných primerů. V PCR byly použity následující oligonukleotidy:

5 Roub skupiny 3

oligo 1 P7999:

5' GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCTGAACCTCAG
AGTGCACGAATTC3' (SEKV. ID. Č. 72)

oligo 2 P8000:

5' TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCTGGTTACG
TCTTCACAGACTATGGAA3' (SEKV. ID. Č. 73)

oligo 3 P8001:

5' CCAACCCATCCATTTTCAGGCCCTTTCCCGGGGCTGCTTAACCCAATTCATTC
CATAGTCTGTGAAGACGT3' (SEKV. ID. Č. 74)

oligo 4 P7995:

5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEKV. ID. Č. 66)

oligo 5 P7997:

5' GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGAATCTGCCCTTGAA3'
(SEKV. ID. Č. 75)

oligo 6 P7998:

5' CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC
AGTGTACTAT3' (SEKV. ID. Č. 76)

oligo 7 P7993:

5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEKV. ID. Č. 77)

Fwd P7996:

5' GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC3' (SEKV. ID. Č. 78)

Bwd P7987:

5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEKV. ID. Č. 71)

100 μ l reakce obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol každého z p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 a p7993, 10 pmol každý p7996 a p7987 a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94 °C po dobu 1 minuty, 55 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla reakce extrahována směsí fenolu a chloroformu (1/1), poté chloroformem a precipitována ethanolem. Po centrifugaci byla DNA rozpuštěna v příslušném restriktivním pufru a štěpena ApaI a KpnI. Výsledný fragment byl izolován z agarózového gelu a ligován do pMR14 (obrázek 5), který byl dříve štěpen stejným enzymem. pMR14 obsahují humánní gama 4 konstantní úseky těžkého řetězce. Když pMR14 je štěpen ApaI a KpnI, naštěpený vektor je schopný přijmout štěpenou DNA tak, že 3' konec štěpené DNA se ve čtecím rámci spojí s 5' koncem sekvence kódující konstantní úsek gama 4. Tudíž těžký řetězec exprimovaný tímto vektorem má izotyp gama 4. Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* LM1035 a výsledné bakteriální kolonie byly podrobeny screeningu restriktivním štěpením a analýze nukleotidovým sekvencováním. Takto byl identifikován plazmid obsahující správnou sekvenci pro gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11) (obrázek 11).

Produkce CDR–roubovaného modifikovaného Fab Fragmentu

CDR–roubovaný modifikovaný Fab fragment, založený na protilátce hTNF40, byl konstruován s použitím *E. coli* vektoru pTTO–1. Variabilní úseky protilátky hTNF40 byly subklonovány do tohoto vektoru a intergenové sekvence byly optimalizovány za vzniku pTTO(CDP870). pTTO expresní vektor byl navržen za vzniku rozpustné periplazmatické akumulace rekombinantních proteinů v *E. coli*. Hlavní charakteristické vlastnosti tohoto plazmidu jsou:

- (i) marker rezistence na tetracyklin – přičemž antibiotikum není inaktivováno produktem genu rezistence, proto je udržována selekce buněk obsahujících plazmid,
- (ii) nízký počet kopií – počátek replikace pocházející z plazmidu p15A, který je kompatibilní s plazmidy obsahujícími replikony pocházející z colE1,
- (iii) silný indukovatelný tac promotor pro transkripci klonovaného genu(ů),
- (iv) lacI^q gen – propůjčuje konstitutivní exprese lac represorového proteinu, udržujícího tac promotor v reprimovaném stavu až do indukce s IPTG/allolaktózou,
- (v) OmpA signální sekvence – zajišťuje periplazmatickou sekreci klonovaného genu(ů), a
- (vi) translační připojení OmpA signální sekvence ke krátkému lacZ peptidu, zajišťující účinnou iniciaci translace.

Vektor byl vyvinut pro expresi modifikovaných Fab fragmentů z dicistronové mRNA tak, že byla navržena metoda pro empirický výběr optimální intergenové sekvence ze série 4 cíleně připravených kazet. Použití je popsáno při konstrukci pTTO(CDP870).

Materiál a metody

40

Techniky DNA

Standardní postupy byly použity pro protokoly zahrnující DNA restriktci, elektroforézu na agarózovém gelu, ligaci a transformaci. Restriktivní enzymy a DNA modifikující enzymy byly získány od firem New England Biolabs nebo Boehringer Mannheim a byly použity podle doporučení výrobce. DNA fragmenty byly purifikovány z agarózy s použitím protokolu GeneClean (BIO 101). Oligonukleotidy byly dodány firmou Oswel Oligonukleotid Service a byly syntetizovány v měřítku 40 nM. Plazmidová DNA byla izolována s použitím souprav Plazmid DNA Mini/Midi od firmy Qiagen. PCR bylo prováděno s použitím Perkin Elmer „Amplitaq“ dle doporučení. DNA sekvencování bylo prováděno s použitím soupravy pro sekvencování Applied Biosystem Taq cycle.

50

Indukce v třepaných baňkách

E. coli W3110 kultury byly pěstovány v médiu L-broth doplněném tetracyklinem (7,5 g/ml). Pro indukce byly čerstvé přes noc rostoucí kultury (pěstované ve 30 °C) naředěny na OD₆₀₀ 0,1 do 200 ml L-broth ve 2 l kultivačních baňkách a byly pěstovány ve 30 °C v orbitálním inkubátoru. Při OD₆₀₀ 0,5 byl přidán IPTG do koncentrace 200 μM. V intervalech byly odebrány vzorky (normalizované dle OD).

Periplazmatická extrakce

Vzorky kultury byly ochlazeny na ledu (5 minut), a poté byly buňky sklizeny centrifugací. Po resuspendování v extrakčním pufru (100 mM Tri HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) byly vzorky inkubovány přes noc ve 30 °C, a poté vyčištěny centrifugací.

Test sestavení

Koncentrace modifikovaných Fab byly určovány pomocí testu ELISA. Destičky byly potaženy ve 4 °C přes noc s anti-humánní Fd 6045 (2 μg/ml ve vazebném pufru, fyziologický roztok, 100 μl na jamku). Po promytí byly jamky plněny 100 μl vzorku, jako standard byl použit purifikovaný A5B7 gama-1 Fab', původně v koncentraci 2 μg/ml. Vzorky byly sériově naředěny 2 krát napříč přes destičku konjugačním pufrům (na 1 litr: 6,05 g trisaminomethanu, 2,92 g NaCl, 0,1 ml Tween-20, 1 ml kaseinu (0,2%)), destičky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti, s třepáním. Destičky byly promyty a usušeny, a poté bylo přidáno 100 μl anti-humánní C-kappa (GD12)-peroxidázy (naředěno v konjugačním pufru). Inkubace byla prováděna při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny s třepáním. Destičky byly promyty a usušeny, a poté bylo přidáno 100 μl roztoku substrátu (10 ml roztoku acetát sodný/citrát (0,1M pH 6), 100 μl roztoku H₂O₂, 100 μl roztoku tetramethylbenzidinu (10 mg/ml v dimethylsulfoxidu)). Absorbance v 630 nm byla odečítána 4 až 6 minut po přidání substrátu.

Konstrukce plazmidu pTTO-1

(a) nahrazení pTTQ9 polylinkeru

Plazmid pTTQ9 byl získán od firmy Amersham a je ukázán na obrázku 14. Alikvot (2 μg) byl štěpen restričními enzymy SalI a EcoRI, štěpný produkt byl puštěn na 1% agarózovém gelu a velký DNA fragment (4520 bp) byl purifikován. Byly syntetizovány dva oligonukleotidy, které po společném nasednutí kódují úsek OmpA. polylinkeru ukázaný na obrázku 15. Tato sekvence má kohezivní konce, které jsou kompatibilní se SalI a EcoRI konci vytvořenými restrikci pTTQ9. Klonováním této oligonukleotidové 'kazety' do pTTQ9 vektoru nebylo regenerováno místo SalI, ale místo EcoRI bylo udrženo. Kazeta kóduje prvních 13 aminokyselin signální sekvence *E. coli* proteinu OmpA vnější membrány, předcházených Shine-Dalgarno vazebným místem pro ribozom OmpA genu. Kromě toho jsou přítomna restriční místa pro enzymy XbaI, MunI, StyI a SpII. MunI a StyI místa jsou v kódujícím úseku OmpA signální sekvence a jsou zamýšlena jako 5' klonovací místa pro inzerci genů. Dva oligonukleotidy, které vytváří tuto kazetu, byly spojeny dohromady smícháním v koncentraci 5 pmol/μl a zahříváním ve vodní lázni na 95 °C po dobu 3 minut, a poté pomalým ochlazením na teplotu místnosti. Spojená sekvence pak byla ligována do pTTQ9 štěpeného SalI/EcoRI. Výsledný plazmidový meziprodukt, nazvaný pTQOmp, byl ověřen pomocí DNA sekvencování.

(b) Příprava a ligace fragmentu

Plazmid pTTO-1 byl konstruován ligací jednoho DNA fragmentu z plazmidu pACYC184 ke dvěma fragmentům vytvořeným z pTQOmp. Plazmid pACYC184 byl získán od firmy New England Biolabs a restriční mapa je ukázána na obrázku 16. Alikvot (2 bg) byl štěpen do úplnosti restričním enzymem StyI, a pak podroben působení nukleázy z fazolí mungo, což vytvořilo slepé konce odštížením 5' báze přesahů. Po fenolové extrakci a ethanolové precipitaci byla DNA štěpena enzymem PvuII, za vytvoření fragmentů o velikosti 2348, 1081, 412 a 403 bp. fragment o velikosti 2348 bp byl purifikován po elektroforéze na agarózovém gelu. Tento

fragment kóduje marker rezistence na tetracyklin a p15A počátek replikace. Fragment pak byl podroben působení alkalické fosfatázy z telecího střeva, aby se odstranily 5' koncové fosfáty, a tím se této molekule zabránilo v ligaci sama k sobě.

- 5 Alikvot (2 µg) plazmidu pTQOmp byl štěpen enzymem SspI a EcoRI a fragment o velikosti 2350 bp byl purifikován z nežádoucích fragmentů o velikosti 2040 bp a 170 bp po elektroforéze na agarózovém gelu, tento fragment kóduje úsek transkripčního terminátoru a gen *lacI^q*. Další alikvot (2 µg) pTQOmp byl štěpen s EcoRI a XmnI, za vzniku fragmentů o velikosti 2289, 1670, 350 a 250 bp. Fragment o velikosti 350 bp, kódující *tac* promotor, *OmpA* signální sekvenci a multiklonovací místo, byl purifikován přes gel.

- 15 Tři fragmenty byly poté ligovány s použitím přibližně ekvimolárního množství každého fragmentu za vzniku plazmidu pTTO-1. Všechna klonovací spojení byla ověřena pomocí DNA sekvencování. Restrikční mapa tohoto plazmidu je ukázána na obrázku 17. Plazmid pTTO-2 byl pak vytvořen inzercí DNA kódující konstantní doménu lehkého řetězce kappa humánního Ig. Ta byla získána jako SpII – EcoRI restrikční fragment z plazmidu pHC132 a vložena na odpovídající místa v pTTO-1. Plazmid pTTO-2 je ukázán na obrázku 18.

Inzerce humanizovaných hTNF40 variabilních úseků do pTTO-2

- 20 Variabilní úsek lehkého řetězce hTNF40gL1 (SEKV. ID. Č. 8) byl získán pomocí PCR „záchrany“ z odpovídajícího vektoru pro expresi v savčích buňkách pMR10.1. *OmpA* vedoucí sekvence nahradila nativní Ig vedoucí sekvenci. Sekvence PCR primerů je ukázána níže:

5' primer: CGCGCGGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGCAAG
CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEKV. ID. Č. 79)

3' primer: TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEKV. ID. Č. 80)

- 25 Po PCR ve standardních podmínkách byl produkt purifikován, štěpen enzymy MunI a SpII, a poté purifikován přes gel. Purifikovaný fragment byl poté vložen do MunI/SpII míst v pTTO-2 za vzniku meziprojektu lehkého řetězce pTTO(hTNF40L).

- Variabilní úsek těžkého řetězce gh3hTNF40.4 byl získán stejným způsobem z vektoru pGamma-4. Sekvence PCR primerů je ukázána níže:

5' primer: GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTTGCCACCGTGGCGCAAG
CTGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEKV. ID. Č. 81)

3' primer: GCCTGAGTTCCACGACAC (SEKV. ID. Č. 82)

- 35 Po PCR byl produkt purifikován, štěpen enzymy NheI a ApaI, a poté byl subklonován do vektoru pDNABEng-GI (obrázek 19). Po ověření pomocí DNA sekvencování byl těžký řetězec štěpen enzymem EcoRI a subklonován do EcoRI místa v pTTO(hTNF40L) za vzniku *E. coli* expresního plazmidu pTTO(hTNF40).

Optimalizace intergenové sekvence pro expresi modifikovaného Fab

- 40 Ve vektoru pTTO nastává exprese modifikovaného Fab z dicistronické RNA kódující nejdříve lehký řetězec, a poté těžký řetězec. DNA sekvence mezi těmito dvěma geny (intergenová sekvence, IGS) může ovlivnit stupeň exprese těžkého řetězce působením na rychlost iniciace translace. Například krátká intergenová sekvence může mít za následek translační spojení mezi lehkými a těžkými řetězci, ve kterém translační ribozom nemusí plně disociovat z mRNA po

ukončení syntézy lehkého řetězce před iniciací syntézy těžkého řetězce. „Síla“ jakéhokoliv vazebného Shine-Dalgarnova (SD) místa ribozomu (homologie s 16 rRNA-) může mít také vliv, stejně jako vzdálenost a složení sekvence mezi SD a ATG startovacím kodonem. Potenciální sekundární struktura mRNA kolem ATG je další důležitý faktor, ATG by měl být v „kličce“ a ne stísněný ve „stonku“, zatímco pro SD to platí opačně. Tak modifikací složení a délky IGS je možné modifikovat sílu iniciace translace, a tudíž stupeň produkce těžkého řetěz. Je pravděpodobné, že pro maximalizaci exprese těžkého řetězce daného modifikovaného Fab je nutné dosáhnout optimální rychlosti iniciace translace. Například, pro jeden modifikovaný Fab může být tolerován vysoký stupeň exprese, ale pro odlišný modifikovaný Fab s odlišnou aminokyselinovou sekvencí se ukáže vysoký stupeň exprese jako toxický, možná pro odlišnou účinnost sekrece nebo skládání. Z tohoto důvodu byly navrženy série čtyř intergenových sekvencí (obrázek 20) umožňujících empirické stanovení optimálních IGS pro modifikovaný Fab založený na hTNF40. IGS1 a IGS2 mají velmi krátké intergenové sekvence (-1 a +1, v daném pořadí) a je možné očekávat vznik těsně spojené translace, SD sekvence (podtrženo) jsou slabě odlišné. Tyto dvě sekvence s největší pravděpodobností propůjčují vysoký stupeň iniciace translace. IGS3 a IGS4 mají delší vzdálenost mezi startovacím kodonem a stop kodonem (+13) a liší se ve složení svých sekvencí, IGS3 má „silnější“ SD sekvence. Všechny sekvence byly studované na výskyt sekundární struktury (s použitím programu m/fold) a „optimalizovány“ co možná nejvíce, ale, při těsném spojení translace dvou řetězců chybění ribozomální disociace znamená, že mRNA nemusí být „nahá“, aby se zabránilo vytvoření sekundární struktury.

Klonování IGS variant

IGS kazety ukázané na obrázku 20 mají hraniční klonovací místa SacI a MunI. Byly vytvořeny nasednutím komplementárních oligonukleotidových párů. Vektorový fragment byl připraven štěpením pTTO(hTNF40) enzymy SacI a NotI a fragment těžkého řetězce byl připraven štěpením pDNAbEngG1 (hTNF40H) enzymy MunI a NotI. Poté byly prováděny trojcestné ligace s použitím ekvimolárních množství dvou restričních fragmentů a přibližně 0,05 pmol každé spojené oligokazety. Tak vznikly čtyři expresní plazmidy pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS 4).

Expresní analýza při kultivaci v třepaných baňkách

Čtyři plazmidy byly transformovány do kmene W3110 *E. coli*, spolu s původním expresním konstruktům, a poté byla analyzována jejich exprese v třepaných baňkách, jak bylo popsáno. Výsledky typického pokusu jsou ukázány na obrázku 21. Odlišné intergenové sekvence propůjčují odlišné expresní profily. IGS1 a IGS2 akumulují periplazmatické modifikované Fab rychle s vrcholem 1 hodinu po indukci, po kterém dosažená hladina padá. Pro IGS1 je vrchol větší a padá ostřeji. Tyto výsledky jsou souhlasné s vysokým stupněm syntézy, jak je očekáváno pro těsně translační spojení u těchto konstruktů. IGS1 zjevně propůjčuje vyšší stupeň exprese těžkého řetězce než IGS2. V tomto případě se zdá, že tento vysoký stupeň exprese je špatně tolerován, protože periplazmatické hladiny exprese padají po 1 hodině vrcholu. To lze pozorovat na růstovém profilu IGS1 kultury (není ukázáno), který vrcholí 1 hodinu po indukci před poklesem svědčícím pro buněčnou smrt a lýzi. IGS3 akumuluje modifikovaný Fab pomaleji, ale vrcholí 2 hodiny po indukci s vyšší hodnotou vrcholu (325 ng/ml/OD) předtím, než se hladiny sníží. Růst této kultury pokračoval 3 hodiny po indukci a dosáhl vyššího vrcholu biomasy (neukázáno). To je v souladu s nižším stupněm syntézy těžkého řetězce. IGS4 akumuluje materiál ještě pomaleji a nezdaří se mu dosáhnout vysoký vrchol produktivity dalších 3 konstruktů. Všechny IGS varianty významně překonaly původní vektor. Hypotéza, že odlišné IGS sekvence propůjčují odlišnou rychlost iniciace translace je podporována těmito experimentálními výsledky. Zdá se, že pro modifikovaný Fab založený na hTNF40 je vysoká rychlost iniciace translace těžkého řetězce špatně tolerována a není tudíž optimální. Pomalejší rychlost propůjčena IGS3 má za následek lepší růstové charakteristiky a proto v průběhu času akumuluje lepší výtěžek.

Po srovnání produktivity ve fermentoru byl IGS3 konstrukt vybrán jako poskytující nejvyšší výtěžek a byl nazván pTTO(CDP870) – viz obrázek 22.

- 5 Těžký řetězec kódovaný plazmidem pTTO(CDP870) má sekvenci označenou jako SEKV. ID. Č. 115 a lehký řetězec má sekvenci označenou jako 3EKV. ID. Č. 113.

PEGylace CDR–roubovaného, modifikovaného Fab založeného na hTMF40

- 10 Purifikovaný modifikovaný Fab je místně specificky konjugován s rozvětvenou molekulou PEG. Tím je dosažena aktivace jednoho cysteinového zbytku ve zkráceném kloubovém úseku modifikovaného Fab, pak následuje reakce s (PEG)–lycyl–maleimidem, jak bylo popsáno už dříve (A.P. Chapman a kol., Nature Biotechnology 17, 780–783, 1999). PEGylovaná molekula je ukázána na obrázku 13 a je nazývána sloučenina CDP870.

- 15 Účinnost PEGylovaného CDR–roubovaného modifikovaného Fab založeného na hTNF40 (CDP870) v léčbě revmatoidní artritidy CDP870 má biologický poločas dlouhý přibližně 11 dnů.

Původci hodnotili bezpečnost a účinnost intravenózně podávané CDP870 v randomizované dvojité slepé klinické zkoušce s placebem a stoupající kontrolovanou dávkou u pacientů s RA.

20

Metody

Pacienti:

- 25 Pacienti ve věku mezi 18 a 75 lety a ti, kteří splnili diagnostická kritéria pro revmatoidní artritidu (RA) revidovaná v roce 1987 American College Rheumatology (ACR) (Arnett al., Arthritis Rheum., 31, 315–324, 1998) byli získáváni z ambulance revmatologické kliniky v Londýně, Cambridgi, Norfolk a Norwichi (Spojené království). Byli požadováni pacienti, kteří měli klinicky aktivní nemoc, což bylo definováno tak, že měli alespoň 3 z následujících kritérií: ≥ 6 bolestivých nebo citlivých kloubů, ≥ 45 minut trvající ranní ztuhlost a rychlost sedimentace červených krvinek (ESR) ≥ 28 mm/hodinu. Pacienti dále nereagovali na léčbu alespoň jedním lékem modifikujícím průběh revmatických nemocí (Disease Modifying Anti–Rheumatic Drug – DMARD) a byli bez léčby po dobu nejméně 4 týdnů. Užívání kortikosteroidů bylo povoleno, jestliže dávka byla $\geq 7,5$ mg/den prednisolonu. Těhotné ženy, kojící ženy a ženy ve fertilním věku neužívající účinnou metodu kontracepce byly vyloučeny. Pacienti byly také vyloučeni, 35 jestliže měli v anamnéze malignitu, současné závažné nekontrolované chorobné stavy, předešlou terapii neutralizující TNF α , která selhala, nebo alergii na polyethylenglykol. Před zapsáním do studie byl od každého pacienta získán psaný souhlas. Studie byla schválena místní etickou komisí pro vědu.

- 40 Léčebný protokol:

- 36 pacientů s RA bylo rozděleno do 3 skupin, které dostávaly stoupající dávku zkoušeného léčiva (1,5 nebo 20 mg/kg). Každá skupina po 12 byla náhodně rozdělena na 8 pacientů, kteří dostávali CDP870 a na 4 pacienty, kteří dostávali placebo. CDP870 byla podávána jako jedna intravenózní infúze (100 ml celkem) po dobu 60 minut. Placebo (pufr acetát sodný) bylo podáváno podobně, 45 jako jedna intravenózní infúze o objemu 100 ml po dobu 60 minut. Léčba byla podávána ambulantně. Po 8 týdnech měli všichni pacienti otevřenou možnost dostat infúzi buď 5 nebo 20 mg/kg CDP870.

Klinické vyhodnocení:

- 50 Aktivita RA byla hodnocena na základě kritérií World Health Organization a International League of Associations for Rheumatology (Boers a kol., J. Rheumatol., Supplement, 41, 86– 89, 1994) a European League Against Rheumatism (EULAR) (Scott a kol., Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521–525, 1992) s hodnocením souboru dat získaných z 28 kloubů. Změny v aktivitě nemoc

byly hodnoceny pomocí stupnice pro aktivitu nemoci (Prevoa a kol., *Arthritis Rheum.*, 38, 44–48, 1995) a kritérií ACR (Felson a kol., *Arthritis Rheum.*, 38, 727–735, 1995). Hodnocení se provádělo před léčbou a 1, 2, 4, 6 a 8 týdnů po léčbě. U pacientů byla také hodnocena bezpečnost a tolerance studovaného léčiva. Při každé vizitě byly hodnoceny hematologické a biochemické parametry a anti-CDP870 protilátky a vedlejší účinky.

Plazmatická koncentrace CDP870 a anti-CDP870 protilátek

CDP870 byla měřena enzymatickým imunotestem (ELISA). Sériová ředění plazmy pacientů byla inkubována na mikrotitrační destičce (Nunc) potažené rekombinantním humánním TNF α (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). Zachycená CDP870 byla detekována koží anti-humánní protilátkou, specifickou pro lehký řetězec kappa, konjugovanou s křenovou peroxidázou (Cappel, ICN), následovanou přidáním tetramethylbenzidinu (TMB) jako substrátu.

S protilátkami k CDP870 byl prováděn screening (s ředěním plazmy 1/10) s použitím „sendvičového“ testu ELISA s dvojitým antigenem s biotinylovanou CDP870 jako druhou vrstvou. Navázané protilátky byly detekovány s použitím HRP-streptavidinu a substrátu TMB. Test byl kalibrován s použitím hyperimunitního králičího standardního IgG. Jednotka aktivity je totožná s 1 μ g králičího standardu.

Statistická analýza

Studie měla výzkumný charakter a velikost vzorku byla založena na předešlé zkušenosti s podobnými přípravky. Účinnost CDP870 byla analyzována vypočtením skóre aktivity nemoci (DAS) a reakcí ACR20/50 na léčebný záměr a na protokol s použitím neměnného testovacího postupu. Skóre aktivity nemoci bylo vypočteno takto: DAS = 0,555 x druhá odmocnina (28 citlivých kloubů) + 0,284 x druhá odmocnina (28 oteklých kloubů) + 0,7 x ln(ESR) + 0,0142 x (pacientovo celkové hodnocení). Nejdříve byly sloučené aktivní skupiny porovnány s placebem. Jestliže toto srovnání bylo významné na 5% hladině, každá dávkovaná skupina byla porovnána s placebem. Všechna srovnání byla dvoustranná s hladinou významnosti 5%. Všechny P-hodnoty pocházely z výzkumných analýz a neměly by být použity pro deduktivní interpretaci.

Výsledky

Demografická situace:

Bylo získáno 36 pacientů s RA. Jejich demografické detaily jsou uvedeny v tabulce 6. Průměrný věk byl 56 let a 30 pacientů byly ženy. Průměrné trvání RA bylo 13 let a 21 pacientů mělo pozitivní revmatoidní faktor. Pacienti v odlišných skupinách měli podobné demografické charakteristiky. V období slepého dávkování 6/12 pacientů léčených placebem opustilo studii kvůli zhoršení RA > 4 týdny po začátku podávání dávky. 2/24 pacientů léčených CDP870 opustilo studii, oba ve skupině s dávkou 1 mg/kg, kvůli zhoršení RA/ztrátě pro další sledování > 4 týdny po začátku podávání dávky. Rozdíl byl statisticky významný ($p=0,009$, Fisherův přesný test).

Tabulka 6

Demografické detaily (průměr \pm standardní odchylka)

	Počet	Pohlaví (M:Ž)	Věk	Trvání nemoci	Revmatoidní faktor	Počet dřívějších DMARD
Placebo	12	1:11	51 \pm 8	12 \pm 8	8 (67%)	5 \pm 1
1 mg/kg	8	1:7	59 \pm 7	12 \pm 7	4 (50%)	4 \pm 1
5 mg/kg	8	2:6	54 \pm 13	13 \pm 5	5 (63%)	5 \pm 2
20 mg/kg	8	2:6	61 \pm 11	14 \pm 13	4 (50%)	4 \pm 2

Klinická účinnost:

Podíl pacientů se zlepšením ACR20 ve skupinách podle jednotlivých protokolů s posledním prováděným sledováním byl 16,7, 50, 87,5 a 62,5% po placebo, 1, 5 a 20 mg/kg CDP870 (účinek kombinované léčby $p=0,012$) ve 4 týdnech a 16,7, 25, 75 a 75% ($p=0,032$) v 8 týdnech. Snížení skóre DAS (medián) ve skupinách podle jednotlivých protokolů s posledním prováděným sledováním bylo 0,15, 1,14, 1,91 a 1,95 po placebo, 1, 5 a 20 mg/kg CDP870 (účinek kombinované léčby $p=0,001$) ve 4 týdnech a 0,31, 0,09, 2,09 a 1,76 ($p=0,008$) v 8 týdnech (obrázek 23). Změny v jednotlivých složkách souboru dat podle World Health Organization a International League of Associations for Rheumatology jsou ukázány na obrázku 24.

Po viditelně značené dávce CDP870 bylo dosaženo podobného prospěšného účinku. Ze 36 pacientů získaných do studie dostalo 32 pacientů druhou infúzi CDP870. Podíl pacientů se zlepšením ACR20 oproti období před první infúzí bylo 72,2 a 55,6% po 5 a 20 mg/kg CDP870 ve 4 týdnech a 55,6 a 66,7% v 8 týdnech.

Výskyt vedlejších účinků

Léčba byla dobře snášena bez reakcí spojených s podáváním infúze. Nebyla hlášena žádná alergická reakce nebo kožní vyrážka. Ve dvojité slepé fázi se vyskytlo 19, 38, 8 a 14 vedlejších účinků ve skupinách s placebem, 1, 5 a 20 mg/kg, v daném pořadí. Nejčastější byly bolesti hlavy s 9 epizodami u 5 pacientů (1 placebo, 3 ve skupině s dávkou 1 mg/kg, 1 ve skupině s dávkou 20 mg/kg). U jednoho pacienta, který dostával placebo a u 3 pacientů, kteří dostali CDP870 (1 ve skupině s dávkou 5 mg/kg a 2 ve skupině s dávkou 20 mg/kg), se objevily infekce dolních cest dýchacích. Byly označeny jako lehké nebo mírné. Byly léčeny perorálními antibiotiky a vyléčeny v průběhu období 1 až 2 týdnů. U tří pacientů ve skupinách s dávkou 1 a 5 mg/kg a u jednoho ve skupině s dávkou 20 mg/kg se objevila infekce močových cest 1 až 2 měsíce po léčení CDP870. Jeden vedlejší účinek byl popsán jako vážný, byla to epizoda bolesti krční páteře, která se objevila 3 dny po infúzi s dávkou 1 mg/kg. U 4 pacientů bylo pozorováno zvýšení anti-nukleárních protilátek: u 1 ve skupině s placebem (negativní až 1/40), u 2 ve skupině s 1 mg/kg (negativní až 1/40, negativní až 1/80) a u 1 ve skupině 20 mg/kg (negativní až 1/40). Co se týče protilátek anti-DNA nebo anti-kardiolipinových protilátek, nebyla zjištěna žádná změna. Plazmatická koncentrace CDP870 a hladina anti-CDP870

Jak bylo očekáváno u všech dávek CDP870, vrcholové plazmatické koncentrace se vyskytovaly na konci infúze a byly proporcionální podávané dávce, přičemž plazmatická koncentrace poté pomalu klesala. Profily plazmatických koncentrací CDP870 vypadaly velmi podobně profilům, které byly dříve pozorovány u dobrovolníků, kdy bylo vypočteno, že biologický poločas je přibližně 14 dnů. Při opětovném podání dávky byl pozorován podobný profil jako u infúze jedné dávky.

Po jedné intravenózní infúzi byly hladiny anti-CDP870 nízké nebo nedetekovatelné.

Diskuse

Neutralizace TNF α je účinná léčebná strategie u RA. V současné době vyžaduje použití biologických přípravků, jako například chimérických mAb nebo fúzního proteinu rozpustný receptor/humánní Fc, které jsou pro výrobu drahé. Léčebný přípravek neutralizující TNF α potřebuje vázat TNF α s vysokou afinitou a musí mít dlouhý biologický poločas, nízkou antigeničnost a vysokou snášenlivost a musí být bezpečný. Je také zapotřebí, aby byl přístupný pro všechny pacienty s RA, kteří by mohli mít prospěch z blokády TNF α . Jedna technika, která by mohla dosáhnout těchto cílů, je konjugace v *E. coli* vytvořeného protilátkového fragmentu vázajícího TNF α s polyethylenglykolem. V této předběžné studii původci zjistili, že CDP870, PEGylovaná anti-TNF α modifikovaná Fab, je účinná a dobře snášena pacienty s RA.

In vitro studie ukázaly, že CDP870 má podobnou TNF α neutralizující aktivitu k myším anti-TNF α parentálním protilátkám. Tato studie potvrdila, CDP870 redukoval zánět a zlepšil příznaky RA. Klinické zlepšení měřené podle kritérií ACR20 u skupin s dávkou 5 a 20 mg/kg (75%, 75%) byly srovnatelné s etanerceptem (60%) (Moreland a kol., *Annals Int. Med.*, 130, 478–486, 1999) a infliximabem (50%) (Maini a kol., *Lancet*, 354, 1932–1939, 1999). U středních a nejvyšších testovaných dávek trval léčebný účinek 8 týdnů, což je srovnatelné s jinými dosavadními mAb (Elliott a kol., *Lancet*, 344, 1105–1110, 1994 a Rankin a kol., *Br. J. Rheumatol.*, 34, 334–342, 1995). Dřívější studie ukázala, že terapeutický účinek anti-TNF α protilátek je ve vztahu k jejich plazmatickému poločasu a vytvoření cirkulujících protilátek (Maini a kol., *Arthritis Rheum.*, 38 (doplnek): S186, 1995 (abstrakt)). Studie původců prokázala, že CDP870 má plazmatický poločas 14 dnů, což je ekvivalentní poločasu celé protilátky (Rankin a kol., (výše)) a mnohem déle než biologický poločas nekonjugovaných Fab' fragmentů. Dále CDP870 vyvolala pouze velmi nízké hladiny stupně protilátkové reakce.

Jedním z důležitých cílů této studie bylo prozkoumat toleranci a bezpečnost podávání tohoto PEGylovaného Fab'. Ve studii původců byla CDP870 dobře tolerována. Ale pro vyhodnocení dlouhodobé toxicity bude nutná další studie, zejména co se týče rizika demyelinizačního onemocnění, infekce a kožních vyrážek, které byly publikovány u léčení etanerceptem a infliximabem.

Úhrnem, CDP870 je terapeuticky účinná u RA, a v této krátkodobé studii byla dobře snášena.

Výše popsané příklady jsou uvedeny pouze jako ilustrativní příklady a neomezují rozsah předkládaného vynálezu, jak je definován následujícími patentovými nároky.

SEZNAM SEKVENCÍ

- <160> 115
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence
- <220>
 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRH1
- <400> 1
 Asp Tyr Gly Met Asn
 1 5
- <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence
- <220>
 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40/ Humánní hybrid
 CDRH2
- <400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRH3

10

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

20 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

25 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

30 <220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL2

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

35

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

40

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

1 5

45

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

5

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRH2

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

10

<210> 8
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

15

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

20

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40-gL1

<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

25

<210> 9
 <211> 321

<212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 5 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<220>
 10 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40-gL2

<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

15 <210> 10
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<220>
 25 <223> Popis umělé sekvence: gh1hTNF40.4 (Figure 10)

<400> 10

cag gtc 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 tcc 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

5 <210> 11
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

15 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: gh3hTNF40.4 (Figure 11)

<400> 11
 gag gtt cag ctg gtc gag tca gga ggc ggt ctc gtg cag cct ggc gga 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tca ctg aga ttg tcc tgt gct gca tct ggt tac gtc ttc aca gac tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

5 <210> 12

<211> 9

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

10 <223> Popis umělé sekvence:

Část sekvence primeru

<400> 12

gccgccacc

9

15 <210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

20 <220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH1

<400> 13

atgaaatgca gctgggtcat sttctt

26

25

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

30

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH2

<400> 14

atgggatgga getrtatcat sytctt

35

26

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH3	
5	<400> 15		
	atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt		26
	<210> 16		
10	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
15	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH4	
	<400> 16		
	atgractttg ggytcagctt grt		23
20	<210> 17		
	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
25	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH5	
	<400> 17		
	atggactcca ggctcaattt agtttt		26
30	<210> 18		
	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
35	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH6	
	<400> 18		
40	atggctgtcy trsgctret attctg		26
	<210> 19		
	<211> 25		
	<212> DNA		
45	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH7	
50	<400> 19		
	atggratgga gckggrtctt tmtctt		25

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 5 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH8

 10 <400> 20
 atgagagtgc tgattctttt gtg 23

 <210> 21
 <211> 26
 15 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH9
 20
 <400> 21
 atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

 <210> 22
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 30 <223> Popis umělé sekvence: primer CH10

 <400> 22
 atgggcagac ttacattctc attcct 26

 35 <210> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 40 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH11

 <400> 23
 atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

 45 <210> 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 50 <220>

	<223> Popis umělé sekvence:	primer CH12	
	<400> 24		
	atgatggtgt taagtcttct gtacct		26
5	<210> 25		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
10	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer 5' end	
	<400> 25		
15	gcgcgcaagc ttgccgccac c		21
	<210> 26		
	<211> 29		
	<212> DNA		
20	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL1	
25	<400> 26		
	atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct		29
	<210> 27		
	<211> 29		
30	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL2	
35	<400> 27		
	atggagwcag acacactcct gytatgggt		29
	<210> 28		
40	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
45	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL3	
	<400> 28		
	atgagtgtgc tcaactcaggt cct		23
	<210> 29		
50	<211> 26		

<212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 5 <223> Popis umělé sekvence: primer CL4

<400> 29
 atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

10 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

15 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL5

<400> 30
 atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

20 <210> 31
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

25 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL5A

<400> 31
 30 atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

<210> 32
 <211> 26
 <212> DNA
 35 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL6

<400> 32
 40 atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

<210> 33
 <211> 23
 45 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL7

50 <400> 33

	atgggcwtca agatggagtc aca	23
	<210> 34	
	<211> 29	
5	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer CL8	
10	<400> 34	
	atgtggggay ctktttycmm tttttcaat	29
	<210> 35	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
	<220>	
20	<223> Popis umělé sekvence: primer CL9	
	<400> 35	
	atggtrtccw casctcagtt cctt	24
25	<210> 36	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
30	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer CL10	
	<400> 36	
	atgtatatat gtttgttgtc tatttc	26
35	<210> 37	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
40	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer CL11	
	<400> 37	
45	atggaagccc cagctcagct tctctt	26
	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> DNA	
50	<213> Umělá sekvence	

	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL12A	
	<400> 38		
5	atgragtywc agacccaggt cttyr		26
	<210> 39		
	<211> 26		
	<212> DNA		
10	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL12B	
	<400> 39		
15	atggagacac attctcaggt ctttgt		26
	<210> 40		
	<211> 26		
20	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL13	
25	<400> 40		
	atggattcac aggcccaggt tcttat		26
	<210> 41		
30	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
	<220>		
35	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL14	
	<400> 41		
	atgatgagtc ctgcccagtt cctggt		26
40	<210> 42		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> Umělá sekvence		
45	<220>		
	<223> Popis umělé sekvence:	primer CL15	
	<400> 42		
	atgaatttgc ctgttcattct cttggtgct		29
50	<210> 43		
	<211> 29		

<212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 5 <223> Popis umělé sekvence: primer CL16

<400> 43
 atggattttc aattggtcct catctcctt 29

10 <210> 44
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

15 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL17A

<400> 44
 atgaggtgcc tarcttsagtt cctgrg 26

20 <210> 45
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

25 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL17B

<400> 45
 30 atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

<210> 46
 <211> 26
 <212> DNA
 35 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CL17C

<400> 46
 40 atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

<210> 47
 <211> 21
 45 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer 5' end

50 <400> 47

	ggactgttcg aagccgccac c	21
	<210> 48	
	<211> 30	
	<212> DNA	
5	<213> Umělá sekvence	
	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer CL12	
10	<400> 48	
	ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt	30
	<210> 49	
	<211> 37	
15	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer R2155	
20	<400> 49	
	gcagatgggc ccttcgttga ggctgmgag acdgtga	37
	<210> 50	
25	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
	<220>	
30	<223> Popis umělé sekvence: primer R1053	
	<400> 50	
	gctgcagac taacagactg ttcc	24
35	<210> 51	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
40	<220>	
	<223> Popis umělé sekvence: primer R720	
	<400> 51	
	gctctcggag gtgctcct	18
45	<210> 52	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Umělá sekvence	
50	<220>	

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7982

<400> 52

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagoc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg 60
taccagcaaa 70

5

<210> 53

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

10

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7983

<400> 53

atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc tttggggct ttacctggtt tttgctgata 60
ccaggctacg t 71

15

<210> 54

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

20

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P79B4

25

<400> 54

tacagtgcct ctttcotcta tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cgtagtgggt 60
actgatttca c 71

<210> 55

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

30

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7985

35

<400> 55

gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60
taccactacc g 71

<210> 56

<211> 89

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

40

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7986

45

<400> 56

atttegccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacatcc ggtcagggta 60
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

5 <210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

10 <220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7981

<400> 57
gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

15 <210> 58
<211> 30
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

20 <220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid P7980

<400> 58
gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

25 <210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

30 <220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid R1053

<400> 59
gctgacagac taacagactg ttcc 24

35 <210> 60
<211> 57
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

40 <220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid R5350

45 <400> 60
tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

50 <210> 61
<211> 59
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid R5349

5 <400> 61
gcagatgggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62

<211> 18

10 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid R684

15 <400> 62
ttcaactgct catcagat 18

<210> 63

20 <211> 65

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

25 <223> Popis umělé sekvence: primer P7989

<400> 63
gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60
aattc 65

30 <210> 64

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

35 <223> Popis umělé sekvence: primer P7990

<400> 64
ggttaagaag cctgggtgctt ccgtcaaagt ttcgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60
agactatggt a 71

40 <210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

45 <220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7991

<400>65

ccaacccatc catttcaggc cttgtcccgg ggccctgcttg acccaattca taccatagtc 60
 tgtgaacacg t 71

<210> 66
 <211> 81
 5 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer P7995

10 <400> 66
 ggccctgaaat ggatggggtg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
 ttcaaggga gattcacgtt c 81

<210> 67
 15 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 20 <223> Popis umělé sekvence: primer P7992

<400> 67
 ccatgtatgc agtgcggttg ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

25 <210> 68
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

30 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer P7993

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

35 <210> 69
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

40 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer P7994

<400> 69
 gaattcgga ccctggccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
 gtacactgag gtgtcctc 78

45 <210> 70
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

5 <223> Popis umělé sekvence: primer P7988

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

10 <210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

15 <220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7987

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

20

<210> 72

<211> 65

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

25

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7999

<400> 72

gatccgccag gctgcaagag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60
 aattc 65

30

<210> 73

<211> 71

<212> DNA

35 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P8000

40 <400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtctctgtct gcatctgggt acgtcttcac 60
 agactatgga a 71

45 <210> 74

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

50 <223> Popis umělé sekvence: primer P8001

<400> 74

ccaaccatc catttcagge cctttcccgg ggctgctta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75

5 <211> 55

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

10 <223> Popis umělé sekvence: primer P7997

<400> 75

ggaggtatgc tgttgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgcc ttgaa 55

15 <210> 76

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

20 <220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7998

<400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60
at 62

25

<210> 77

<211> 78

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

30

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7993

<400> 77

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

35

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

40 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7996

45 <400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

<210> 79

<211> 74
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

5 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: 5' primer

<400> 79
 cgcgcgga ttgcagtggc ottggctggt ttegtaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60
 atgaccaga gcc 74

10 <210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

15 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: 3' primer

<400> 80
 ttcaactgct catcagatgg 20

20 <210> 81
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

25 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: 5' primer

<400> 81
 gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttogccaccg tggcgcaagc tgaggttcag 60
 ctggctcagc caggaggc 78

30 <210> 82
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

35 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: 3' primer

40 <400> 82
 gcctgagttc cagcac 18

<210> 83
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence rámce skupiny I

50

<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

5 <211> 23

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

10 <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeč L1

<400> 84

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 20

15 <210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

20 <220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence L2 rámce skupiny 1

<400> 85

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

25

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

30

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeč L2

<400> 86

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

35

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

40 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence L3 rámce skupiny 1

<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

5 <210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

10 <220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeč L3

<400> 88

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

15

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

20

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence L4 rámce skupiny I

25 <400> 89

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

<210> 90

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeč L4

35

<400> 90

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

<210> 91

40

<211> 30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

45

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H1 rámce skupiny I

<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

5 <210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

10 <220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček H1

<400> 92

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

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

15

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

20

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H2 rámce skupiny I

<400> 93

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

25

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček H2

35

<400> 94

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

<210> 95

<211> 32

40

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H3 rámce skupiny I

<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

- 5 <210> 96
- <211> 32
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence

- 10 <220>
- <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec H3

<400> 96

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln
 1 5 10 15

Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

- 15 <210> 97
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence

- 20 <220>
- <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H4 rámce skupiny I

<400> 97

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

- 30 <210> 98
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence

- <220>
- <223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec H4

35 <400> 98

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

- 40 <210> 99
- <211> 324
- <212> DNA
- <213> myš

- <220>
- <221> CDS

<222> (1).. (324)

<223> variabilní doména lehkého řetězce myši hTNF40

<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

10 <213> myš

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (354)

15 <223> variabilní doména těžkého řetězce myši hTNF40

<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
- 5 <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (29)..(67)
- <223> Popis umělé sekvence: oligonukleotidový adaptor OmpA

<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

- 15 <210> 102
- <211> 67
- <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
- 20 <220>
- <221> CDS
- <222> (2)..(40)

- 25 <220>
- <221> CDS
- <222> (43)..(66)

- 30 <220>
- <223> Popis umělé sekvence: IGS kazeta-1

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

	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Xaa	Xaa	Lys			
	1					5				10					15			
	aag	act	gct	ata	gca	att	g									67		
	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile												
						20												
	<210>	103																
	<211>	69																
5	<212>	DNA																
	<213>	Umělá	sekvence															
	<220>																	
	<221>	CDS																
10	<222>	(2)..(43)																
	<220>																	
	<221>	CDS																
	<222>	(45)..(68)																
15	<220>																	
	<223>	Popis	umělé	sekvence:	IGS	kazeta-2												
	<400>	103																
	g	agc	tca	cca	gta	aca	aaa	agt	ttt	aat	aga	ggg	gag	tgt	taa	a	atg	47
	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				Met	
	1					5				10							15	
	aag	aag	act	gct	ata	gca	att	g										69
	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile											
						20												
20																		
	<210>	104																
	<211>	81																
	<212>	DNA																
25	<213>	Umělá	sekvence															
	<220>																	
	<221>	CDS																
	<222>	(2)..(43)																
30	<220>																	
	<221>	CDS																
	<222>	(57)..(80)																
35	<220>																	
	<223>	Popis	umělé	sekvence:	IGS	kazeta-3												
	<400>	104																
	g	agc	tca	cca	gta	aca	aaa	agc	ttt	aat	aga	gga	gag	tgt	tga			43
	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	1					5				10								
	ggagg	aaaaa	aaa	atg	aag	aaa	act	gct	ata	gca	att	g						81
	Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile										
						15				20								
40																		

<210> 105
 <211> 81
 <212> DNA
 5 <213> Umělá sekvence

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

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (57).. (80)

15 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: IGS kazeta-4

<400> 105
 g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga gga gag tgt tga 43
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5 10
 cgaggattat ata atg aag aaa act gct ata gca att g 81
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 15 20

20 <210> 106
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

25 <220>
 <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H1 rámce skupiny 3

<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

30 <210> 107
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H2 rámce skupiny 3

40 <400> 107
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 108
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

5

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H3 rámce skupiny 3

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

10

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

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

15

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence H4 rámce skupiny 3

20

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

<210> 110
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

25

<220>
 <223> Roubovaný těžký řetězec pro Fab

30

<400> 110
 gaggttcagc tggctcgagtc aggaggcgggt ctctgtgcagc ctggcgggac actgagattg 60
 tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
 ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatztat 180
 gctgacagcg tcaaggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
 ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
 agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcagggcccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacac 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt 648

35

<210> 111
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

40

<220>

<223> Roubovaný těžký řetězec pro Fab

<400> 111

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

5

<210> 112

<211> 642

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

10

<220>

<223> Roubovaný lehký řetězec pro Fab a modifikovaný Fab

<400> 112


```

gacattcaaa tgaccagag cccatccagc ctgagcgcat ctgtaggaga cggggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggt actaacgtag cctgggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaagccct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
aggttcagcg gatccggtag tggtagctgat ttcacctca cgatcagtag cctccagcca 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccaactac attcgggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta ggggccccat ctgtcttcat cttcccggcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaq cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642

```

<210> 113

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný lehký řetězec pro Fab a modifikovaný Fab

10

<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
- 5 <212> DNA
- <213> Umělá sekvence

- <220>
- <223> Roubovaný těžký řetězec pro modifikovaný Fab

10

<400> 114

gaggttcagc	tggtcgagtc	aggaggcgg	ctcgtgcagc	ctggcggatc	actgagattg	60
tcctgtgotg	catctgggta	cgtcttcaca	gactatggaa	tgaattgggt	tagacaggcc	120
ccgggaaagg	gcctggaatg	gatgggttg	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	ccccctggca	ccctoctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctgg	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gctcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tectacagtc	ctcaggactc	540
tactocctca	gcagcgtgg	gaccgtgcc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtcgaca	agaaagttga	gccccaatct	660
tgtgacaaaa	ctcacacatg	cgccgcg				687

- <210> 115
- 15 <211> 229
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence

- <220>
- 20 <223> Roubovaný těžký řetězec pro modifikovaný Fab

<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	

Obr. 1

Srovnání rámcových úseků lehkého řetězce protilátky hTNF40
a kanonických sekvencí humánní skupiny 1

Kánon hum. skupiny 1	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEKV. ID. Č. 83)
hTNF40	:	DI <u>V</u> MTQ <u>S</u> OK <u>F</u> M <u>S</u> T <u>S</u> VGDR <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> T <u>C</u> (SEKV. ID. Č. 84)
Kánon hum. skupiny 1	:	WYQQKPGKAPKLLIY (SEKV. ID. Č. 85)
hTNF40	:	WYQQKPG <u>S</u> PKALIIY (SEKV. ID. Č. 86)
Kánon hum. skupiny 1	:	GVPSRFSGSGSGTDFLTIS S LPEDFATYYC (SEKV. ID. Č. 87)
hTNF40	:	GV <u>P</u> Y <u>R</u> F <u>T</u> SGSGSGTDFLTIS <u>T</u> <u>V</u> Q <u>S</u> E <u>D</u> L <u>A</u> E <u>Y</u> F <u>C</u> (SEKV. ID. Č. 88)
Kánon hum. skupiny 1	:	FGQGTKVEIKR (SEKV. ID. Č. 89)
hTNF40	:	FGAGTK <u>L</u> E <u>L</u> KR (SEKV. ID. Č. 90)

Obr. 3

Sekvence úseků CDR z hTNF40

H1 DYGMN (SEKV. ID. Č. 1)

H2 WINTYIGEP~~I~~YVDDPKG (SEKV. ID. Č. 7)

H2' WINTYIGEP~~I~~YADSVKG (SEKV. ID. Č. 2)

H3 GYRSYAMDY (SEKV. ID. Č. 3)

L1 KASQNVGTNVA (SEKV. ID. Č. 4)

L2 SASFLYS (SEKV. ID. Č. 5)

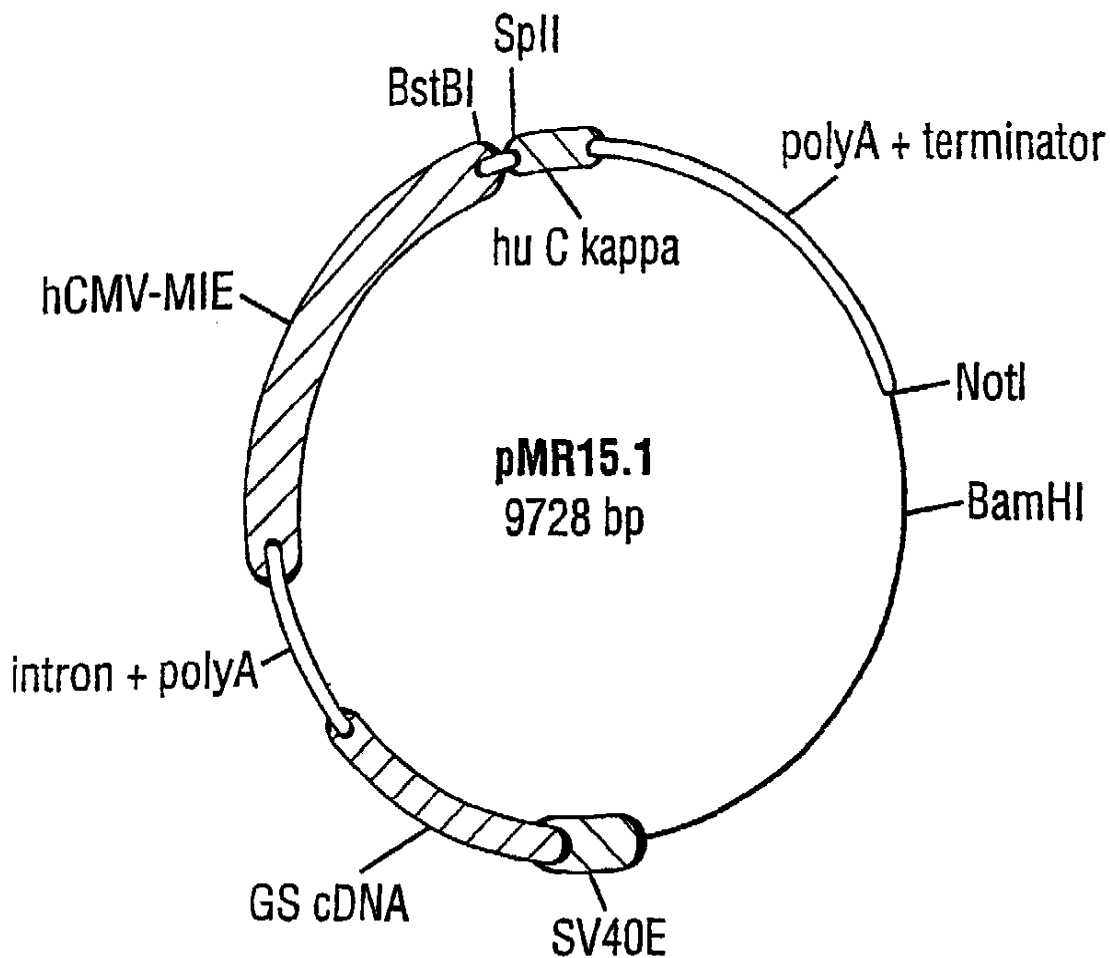
L3 QQYNIYPLT (SEKV. ID. Č. 6)

Obr. 2

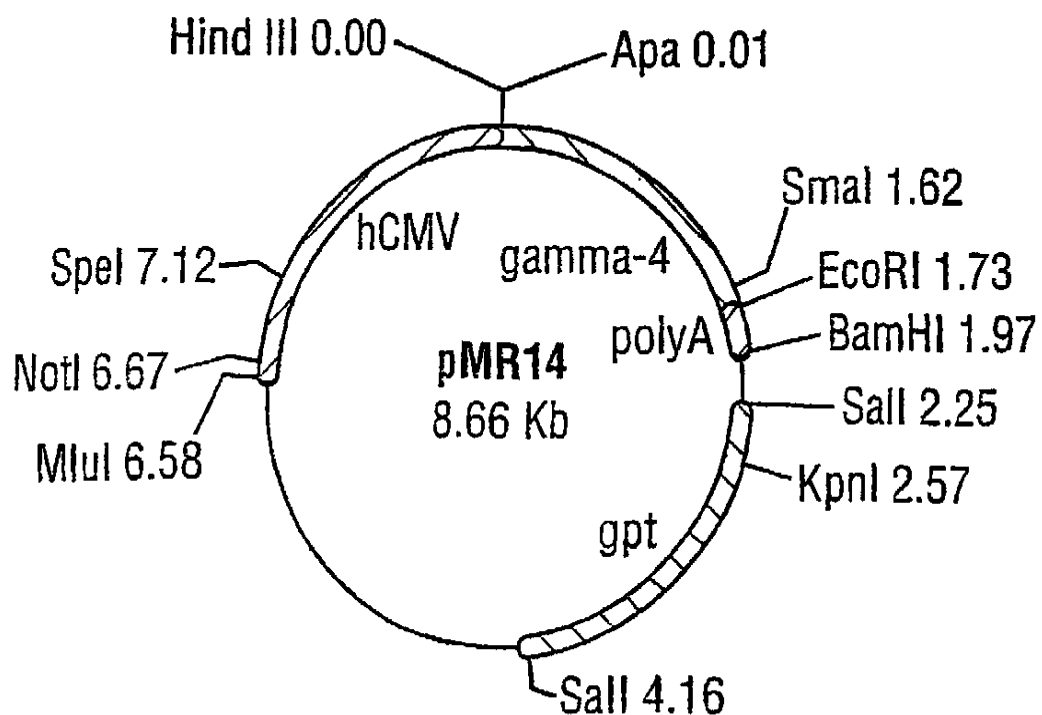
Srovnání rámcových úseků těžkého řetězce protilátky hTNF40 a kanonických sekvencí humánních skupin 1 a 3

Kánon hum. skupiny 1	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEKV. ID. Č. 91)
hTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKLSCKASGYVFT</u> (SEKV. ID. Č. 92)
Kánon hum. skupiny 1	: WVRQAPGGLEWNG (SEKV. ID. Č. 93)
hTNF40	: <u>WVKQAPGKAFKWMG</u> (SEKV. ID. Č. 94)
Kánon hum. skupiny 1	: RVTITRDTSSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEKV. ID. Č. 95)
hTNF40	: <u>RFAPSLETSASTAFLOINNLKNETATYFCAR</u> (SEKV. ID. Č. 96)
Kánon hum. skupiny 1	: WGQGLVTVSS (SEKV. ID. Č. 97)
hTNF40	: <u>WGQGTLLTVSS</u> (SEKV. ID. Č. 98)
Kánon hum. skupiny 3	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEKV. ID. Č. 106)
hTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKLSCKASGYVFT</u> (SEKV. ID. Č. 92)
Kánon hum. skupiny 3	: WVRQAPGKLEWVS (SEKV. ID. Č. 107)
hTNF40	: <u>WVKQAPGKAFKWMG</u> (SEKV. ID. Č. 94)
Kánon hum. skupiny 3	: RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR (SEKV. ID. Č. 108)
hTNF40	: <u>RFAPSLETSASTAFLOINNLKNETATYFCAR</u> (SEKV. ID. Č. 96)
Kánon hum. skupiny 3	: WGQGLVTVSS (SEKV. ID. Č. 109)
hTNF40	: <u>WGQGTLLTVSS</u> (SEKV. ID. Č. 98)

Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Myši VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 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 CCG ACC ATA
V   S   V   T   C   K   A   S   Q   N   Y   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 GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT
Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   F   L>

170     180     190     200     210
TAT AGT GGA GTC CCT TAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
ATA TCA CCT CAG GGA ATA GCG AAG TGT CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA
Y   S   G   V   P   Y   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D   F   T>

220     230     240     250     260     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   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>

```


Obr. 7 Myši Vh sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 100)

10 CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC 50
 GTC TAG GTC AAC CAC GTC AGA CCT GGA CTC GAC TTC TTC GGA CCT CTC TGT CAG
 Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V>
 60 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>
 70
 80
 90
 100
 110 GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GCT TTC AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC 160
 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>
 120
 130
 140
 150
 160
 170 ATT GGA GAG CCA ATA TAT GTT GAT GAC TGC 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 D F K G R F A F B L>
 180
 190
 200
 210
 220 GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TTT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC 270
 CTT TGG AGA CGG TCG TGA CGG AAA AAF L Q I N N L K N E D>
 E T S A S T A F L Q I N N L K N E D>
 230
 240
 250
 260
 270
 280 ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA GGT TAC CGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG
 TGC CGA TGT ATA AAG ACA CGT 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>
 290
 300
 310
 320
 330 GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCT TCA
 CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGA AGT
 G Q G T S V T V S S>
 340
 350

Obr. 8 Roubovaná VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 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   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 TTT CAT CCA TGA TTG CAT CCG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

```

Obr. 9 Roubovaná VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 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 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 TTT GAG 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 ATC GGT ACT AAC GTA GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT GAG GAG TAG TAG ATG TCA 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   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>

```

Obr. 10 Roubovaná Vh sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 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 GGA 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 ATG AAT TGG
    TTT CAA AGC ACA TTC CGG AGT CCG ATG CAC AAG TGT CTG ATA CCA TAC TTA ACC
    K  V  S  C  K  A  S  G  Y  V  F  T  D  Y  G  M  N  W>

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

170 180 190 200 210
    ATT GGA GAG CCT ATT TAT GCT CAA AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC 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  L  R  S  E  D>

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

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

```

Obr. 11 Roubovaná Vh sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 11)

```

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

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

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

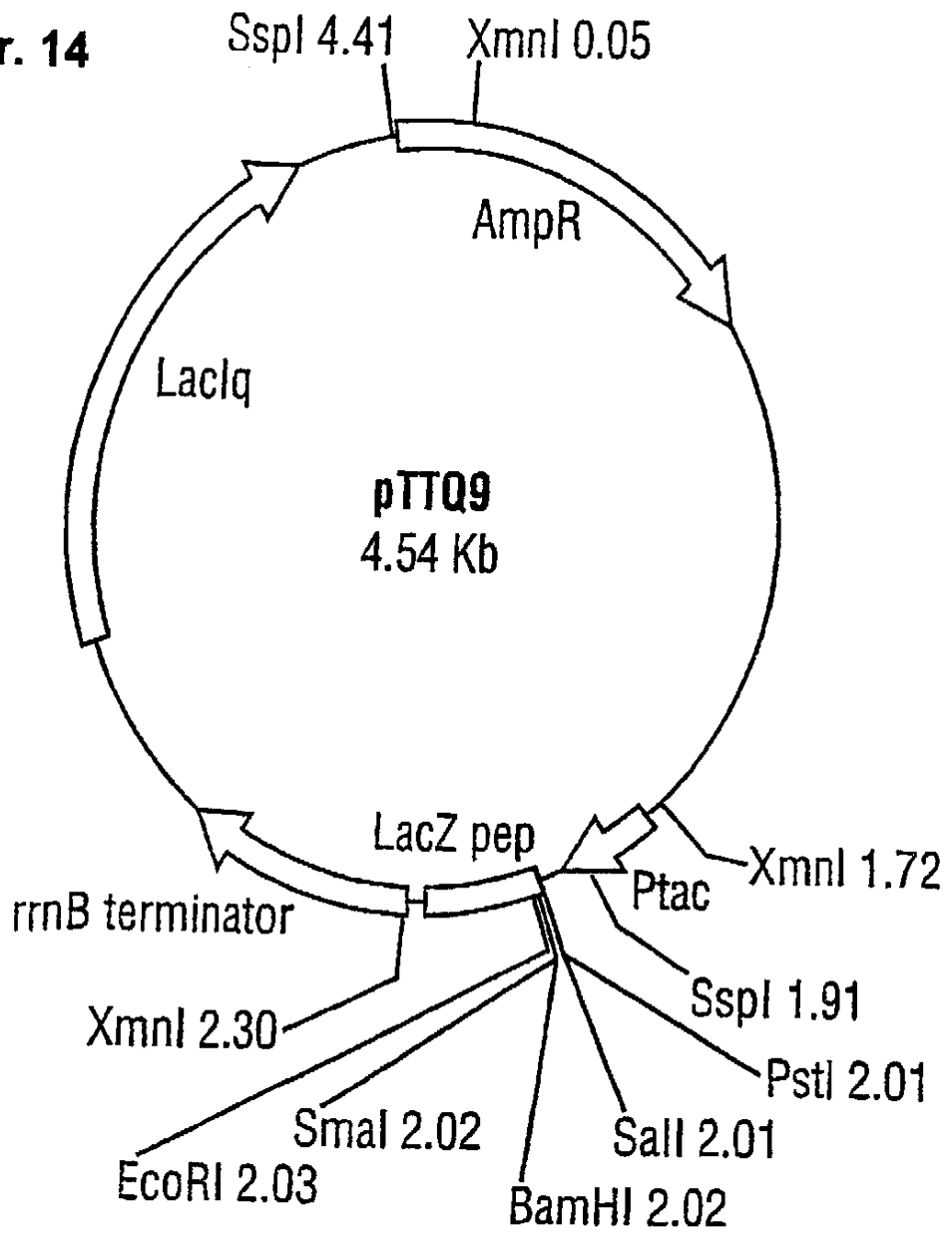
170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCT ATT TAT GCT GAC AGC GTC AAG GGC AGA TTC ACG TTC TCT CTA
TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA CTG TCG CAG TTC CCG TCT AAG TGC AAG AGA GAT
I G E P I Y A D S V K G R F T F S L>

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>

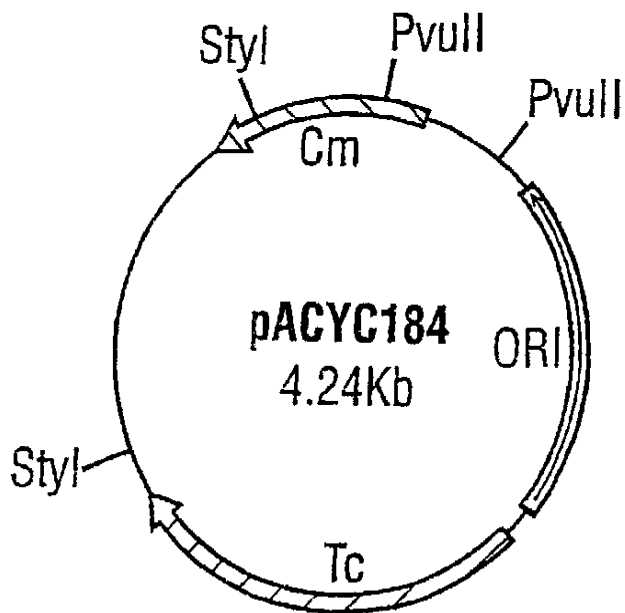
280     290     300     310     320
ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CGG TAC CTG ATG ACC
T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>

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


Obr. 14

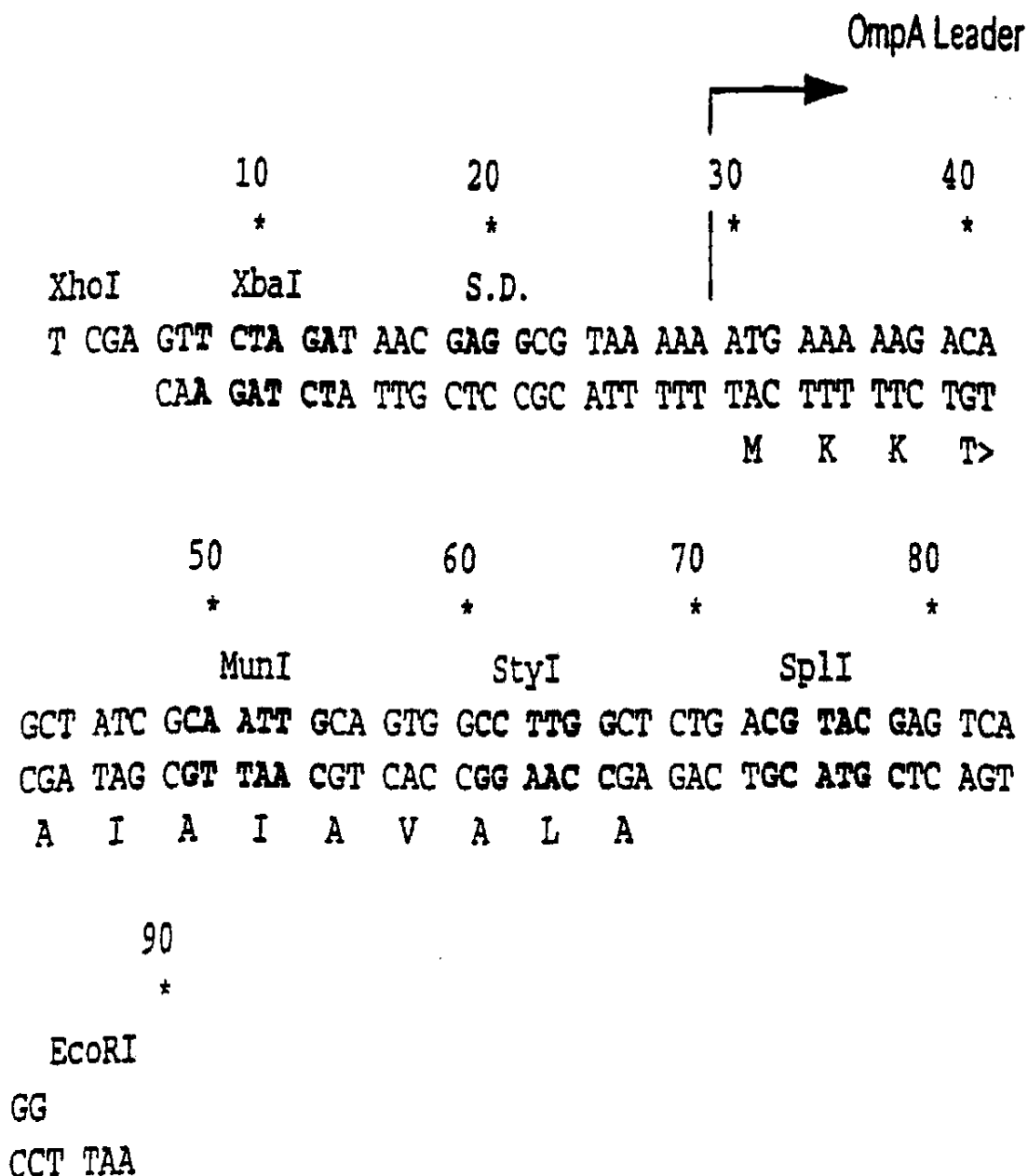


Obr. 16

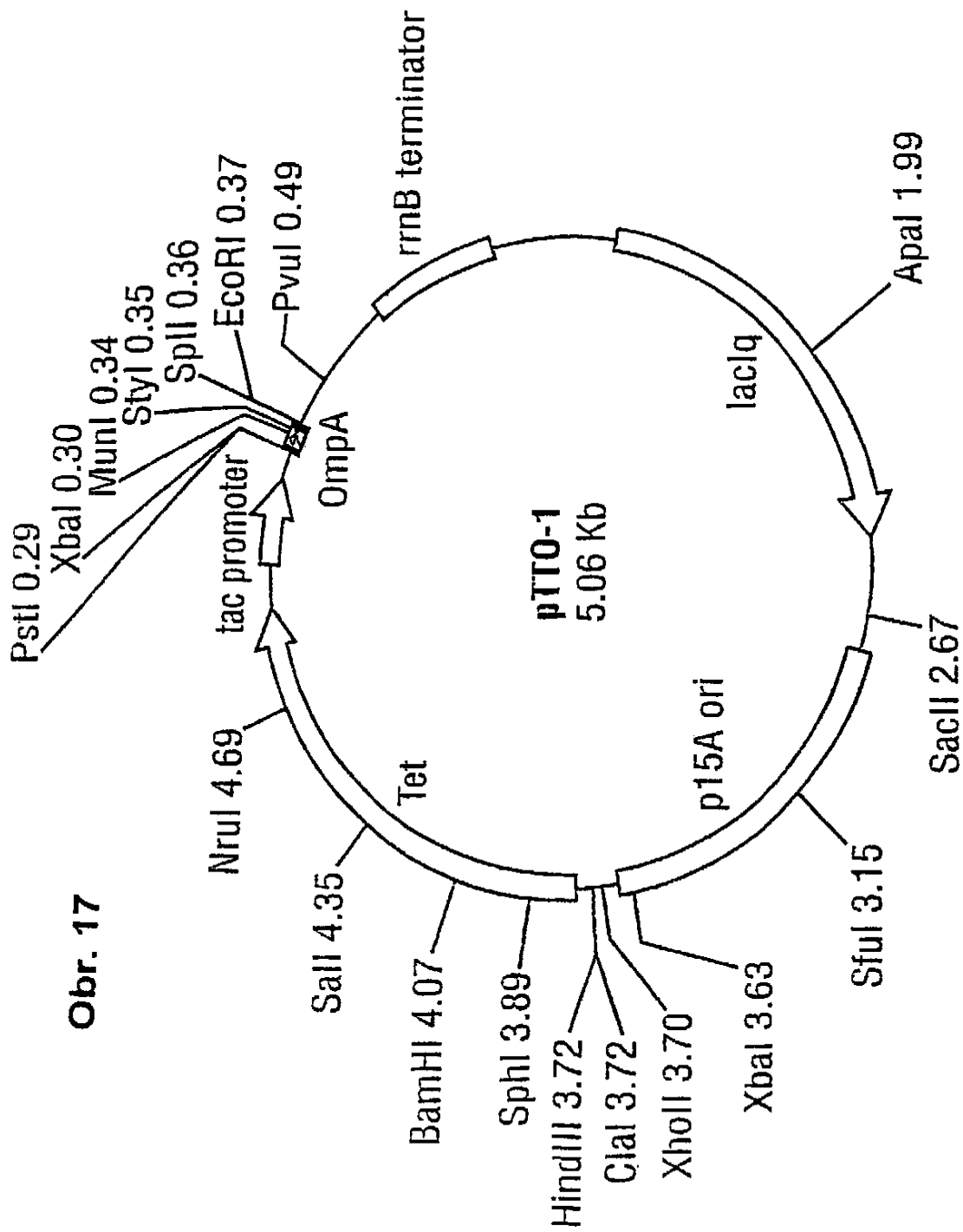


Obr. 15

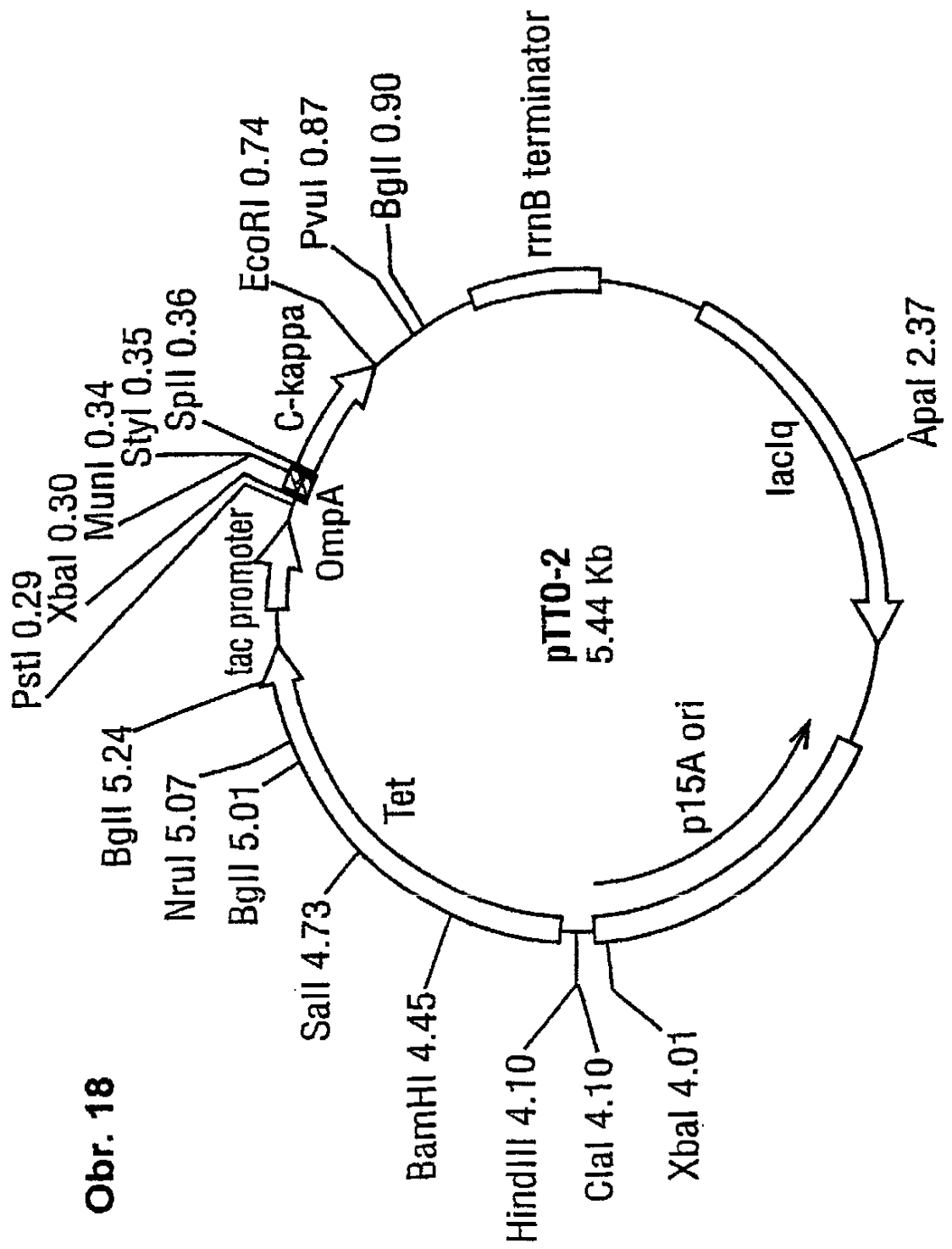
Sekvence oligonukleotidového adaptoru OmpA (SEKV. ID. Č.101)



- interní restrikční místa uvedena tučně
- 5' XhoI kohezivní konce ligují do místa Sall vektoru, blokují ho
- S.D. označuje OmpA Shine-Delgamovu sekvenci

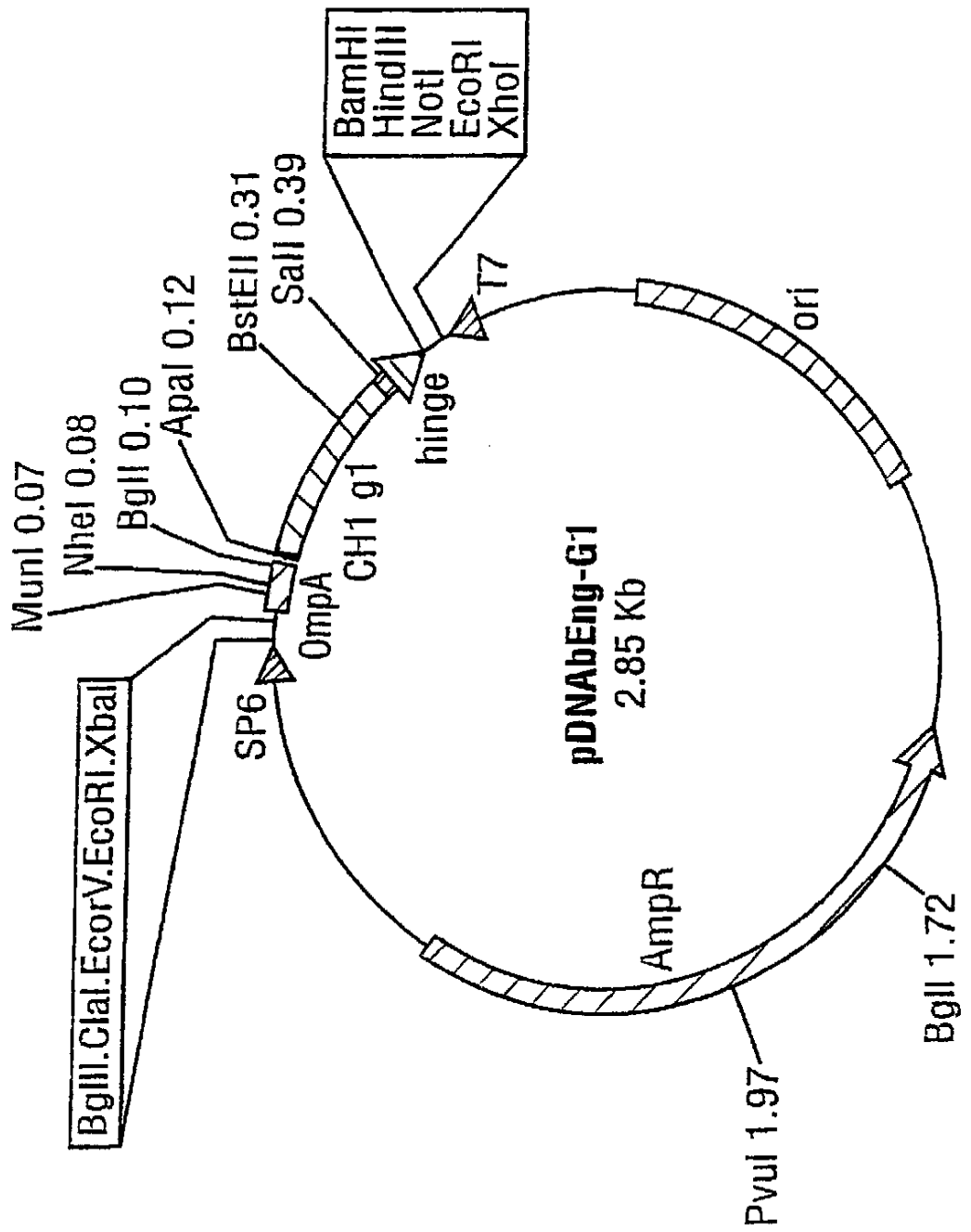


Obr. 17



Obr. 18

Obr. 19



Obr. 20

Oligonukleotidová kazeta kódující různé mezigenové sekvence
pro expresi Fab v *E. coli*

IGS kazeta-1

Intergenic space = -1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TAAATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEKV. ID. Č. 102)

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

Konec sekvence c-Kappa →

Začátek sekvence OmpA →

IGS kazeta-2

mezigenový prostor = +1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AWA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA AATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEKV. ID. Č. 103)

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

IGS kazeta-3

mezigenový prostor = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEKV. ID. Č. 104)

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

IGS kazeta-4

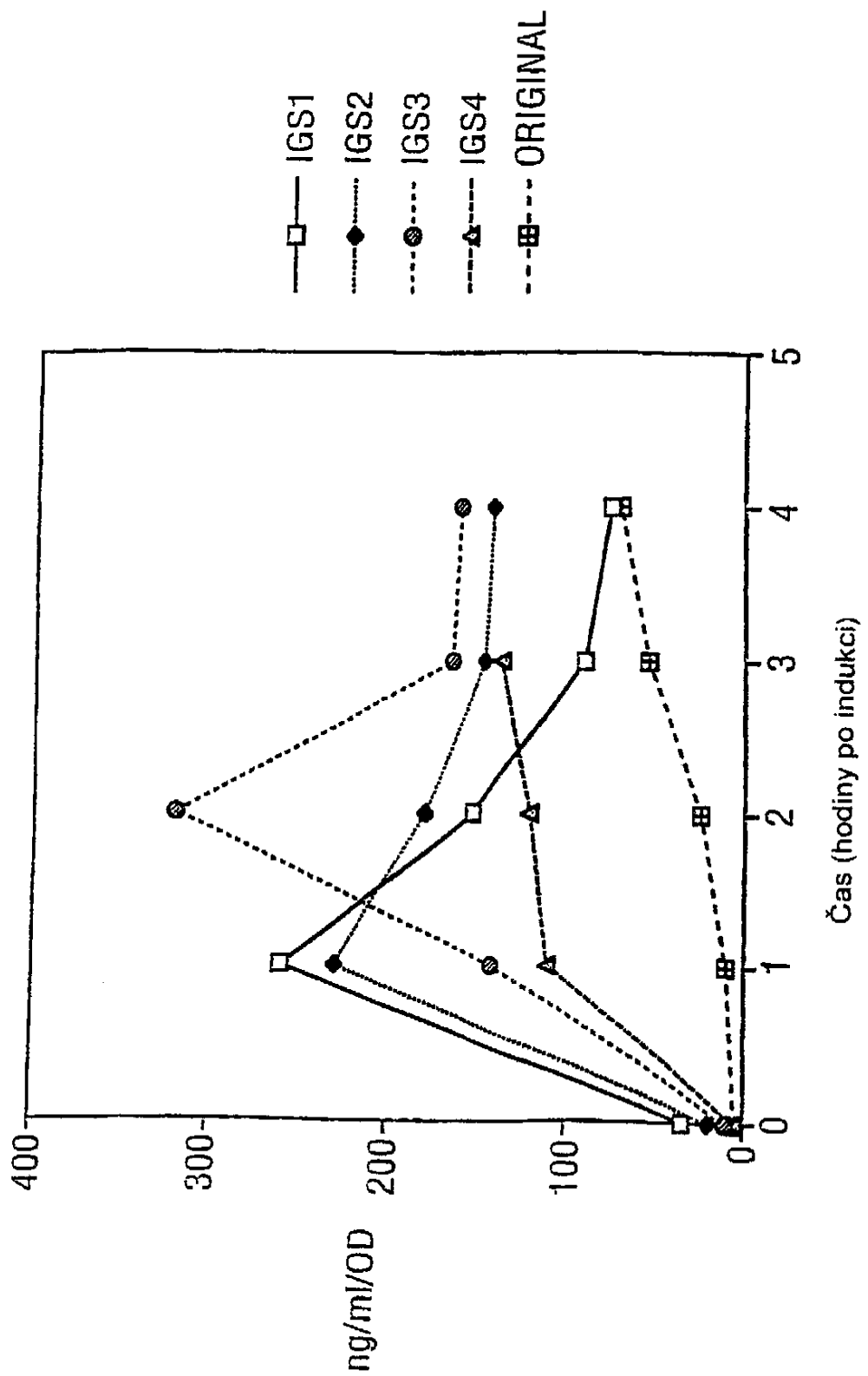
mezigenový prostor = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGAGGATATATATATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEKV. ID. Č. 105)

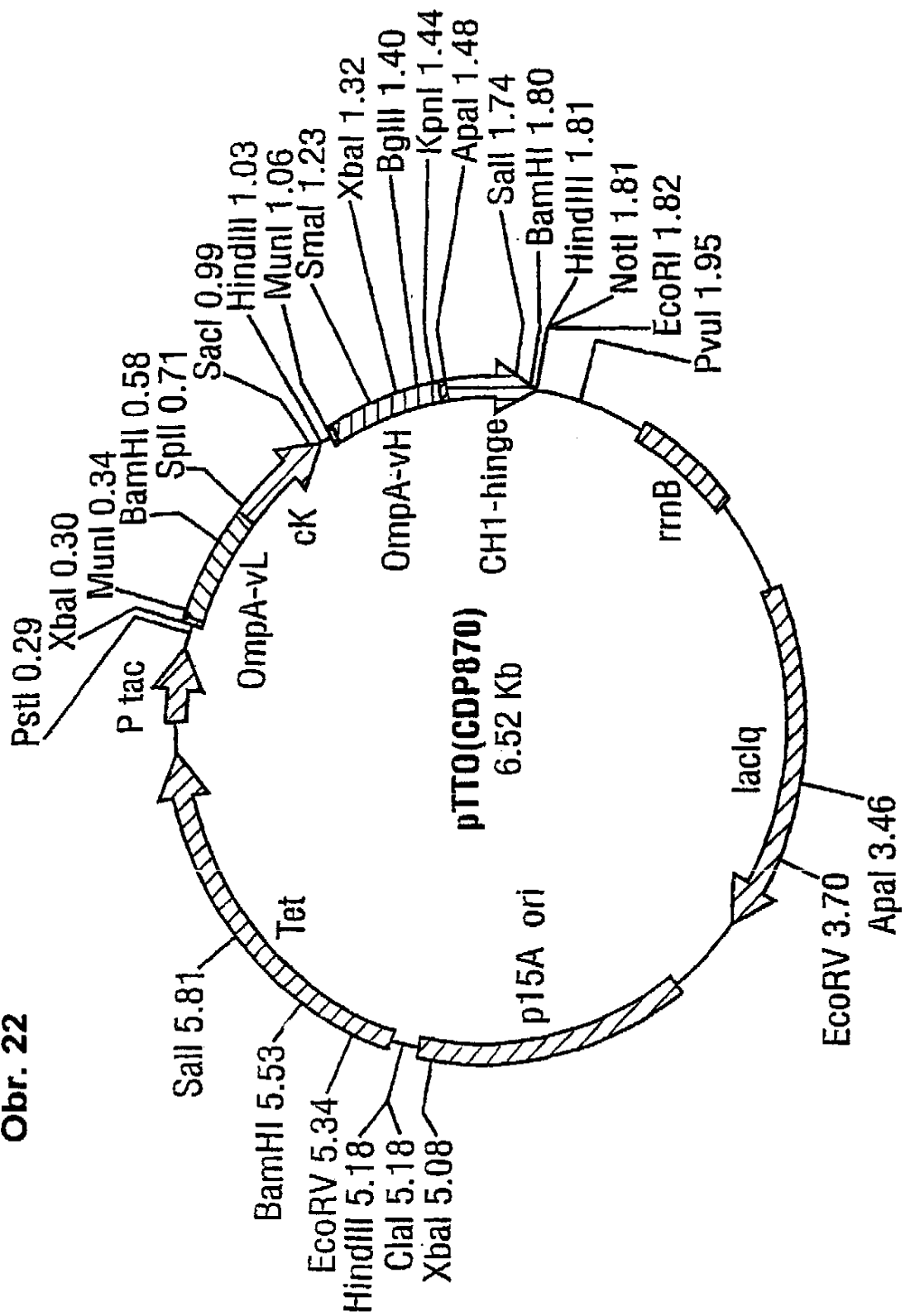
S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Obr. 21

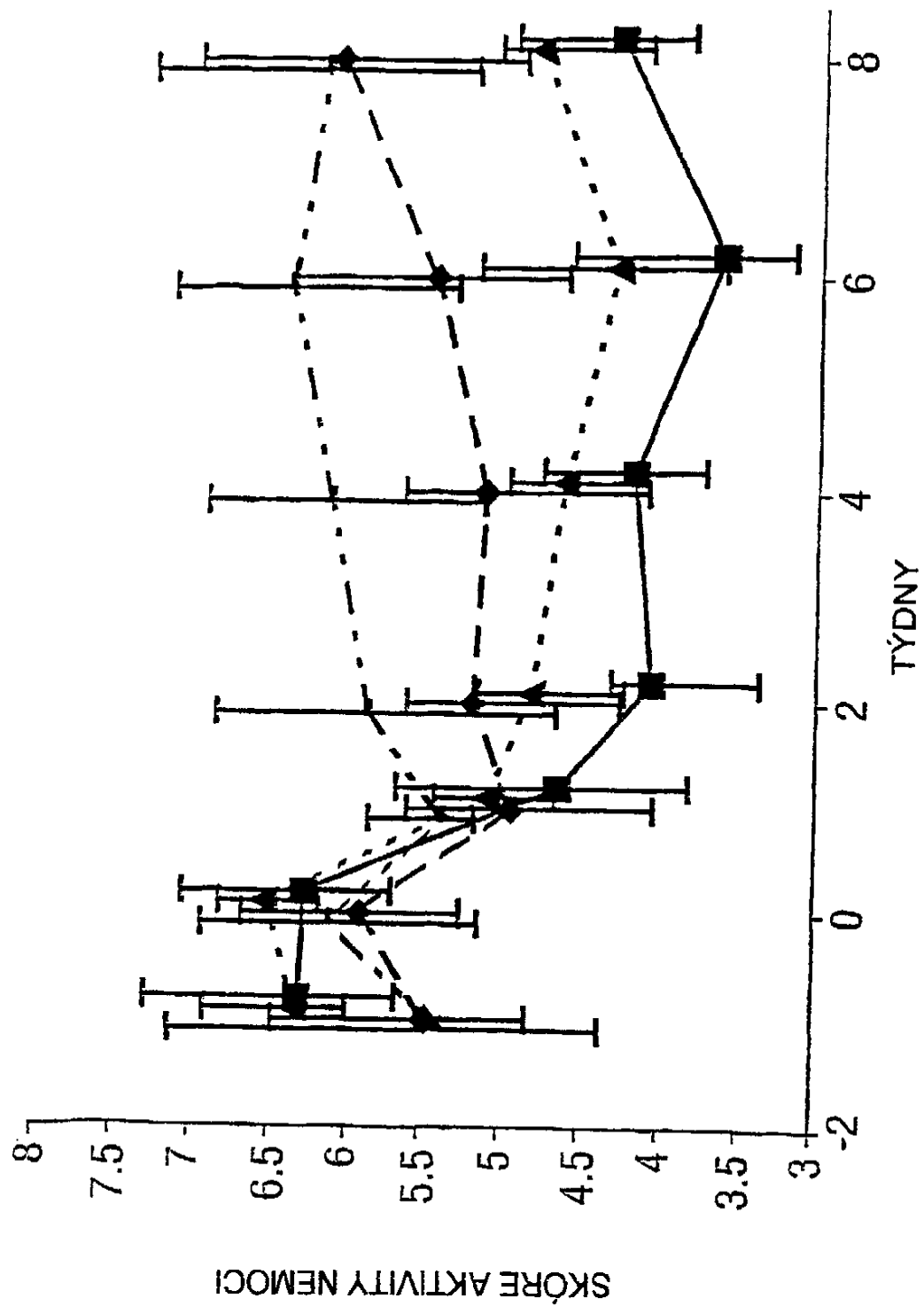
Akumulace Fab' v periplazmě – IGS varianty



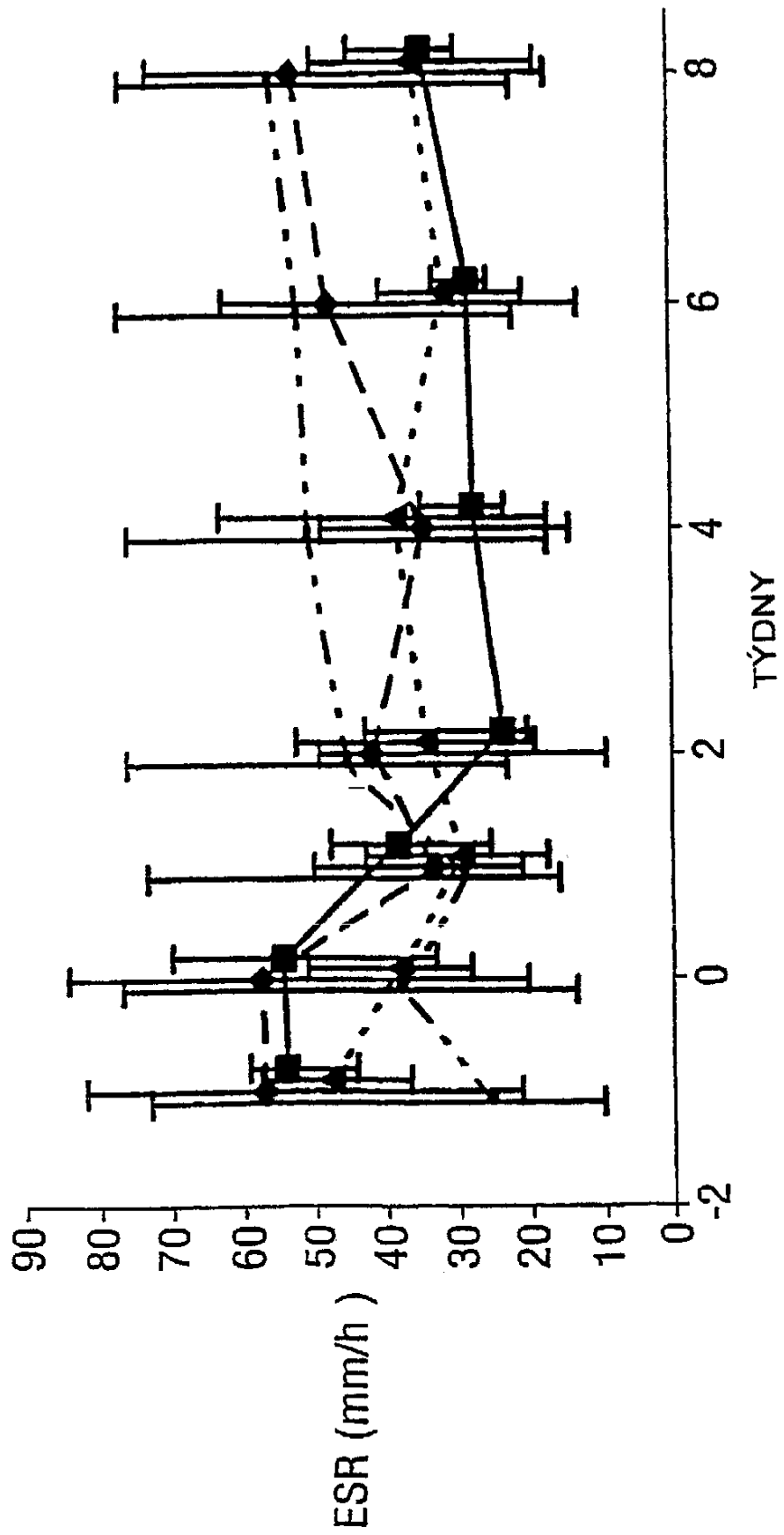
Obr. 22



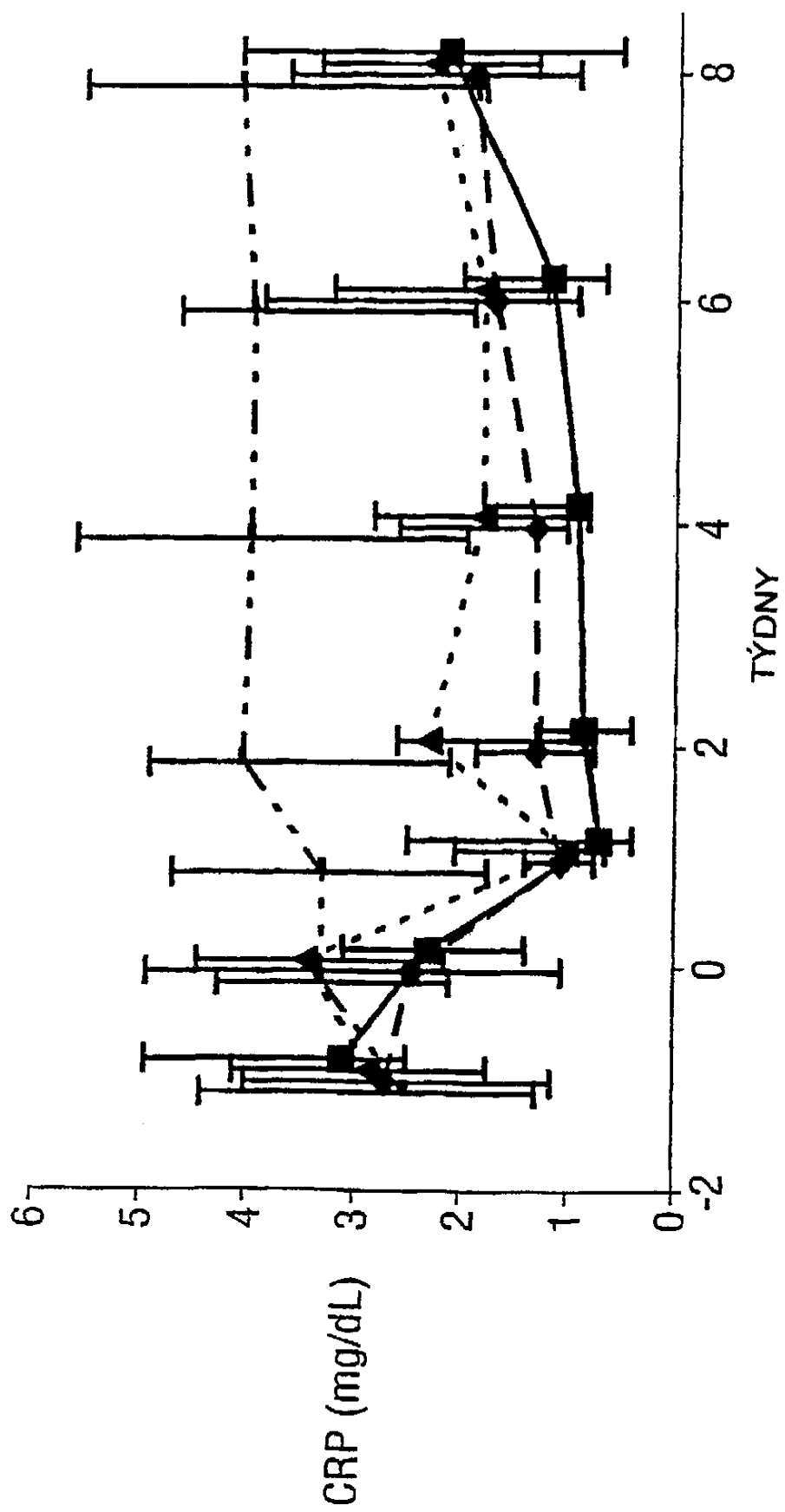
Obr. 23



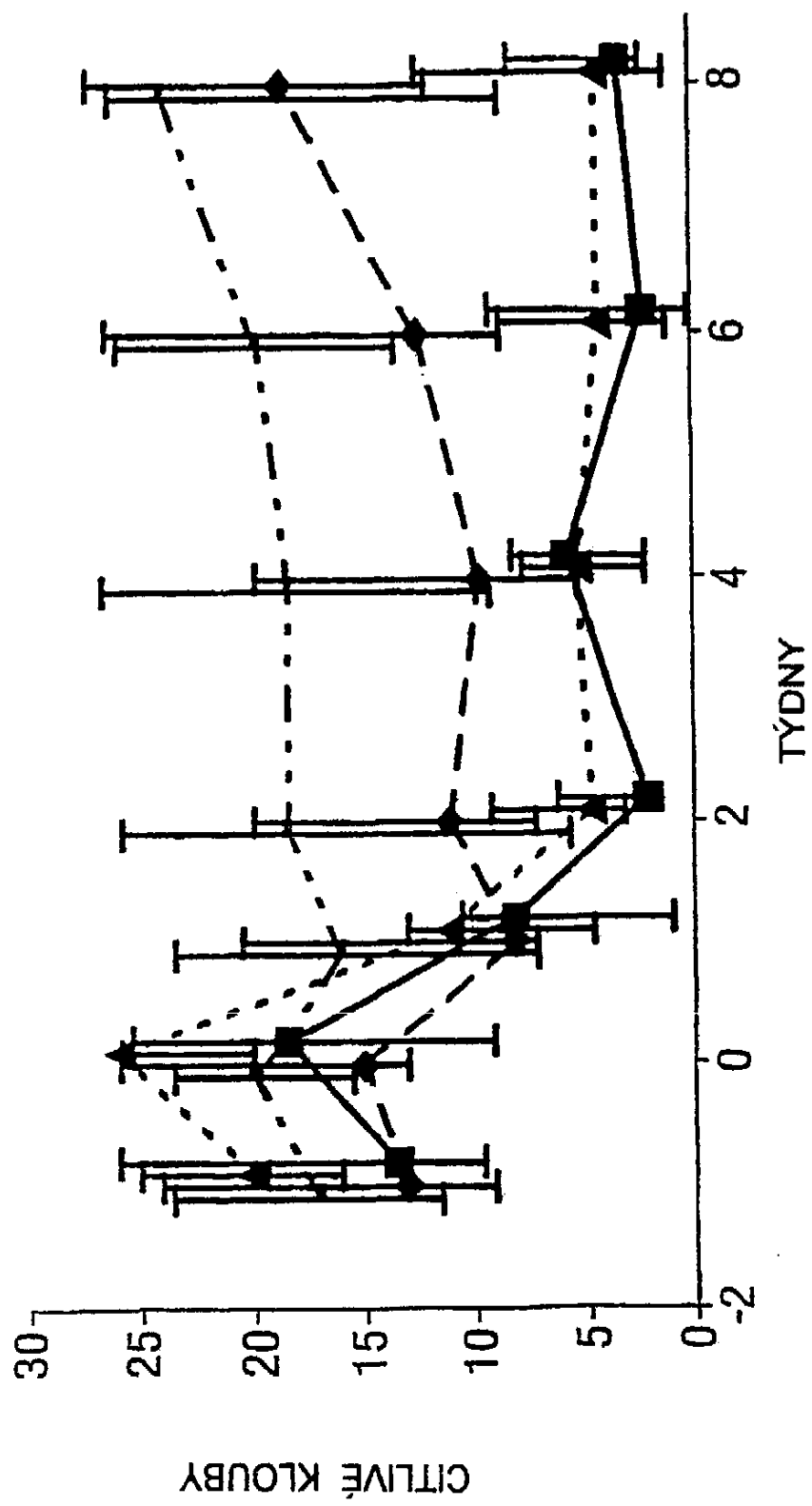
Obr. 24



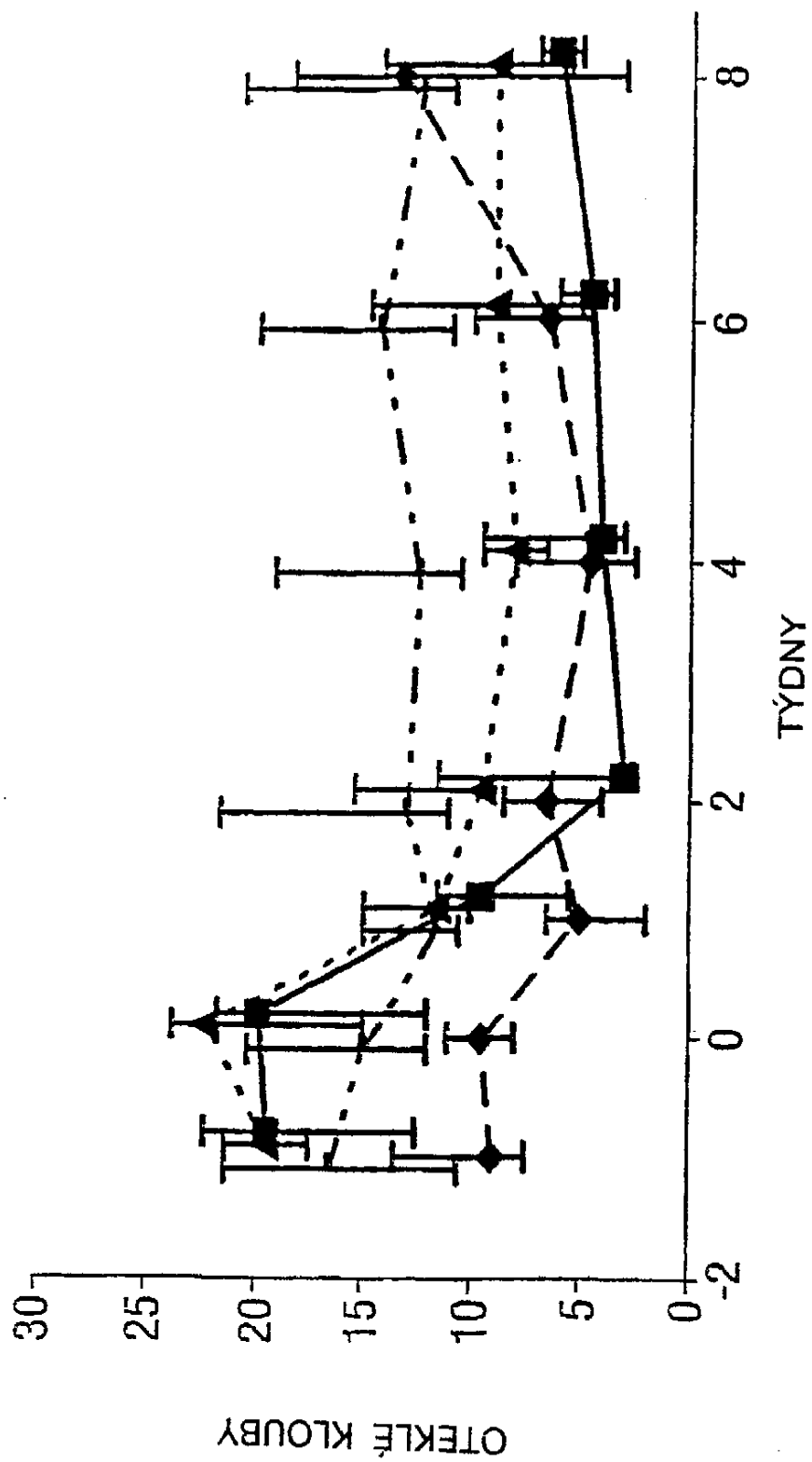
Obr. 24 (pokrač.)



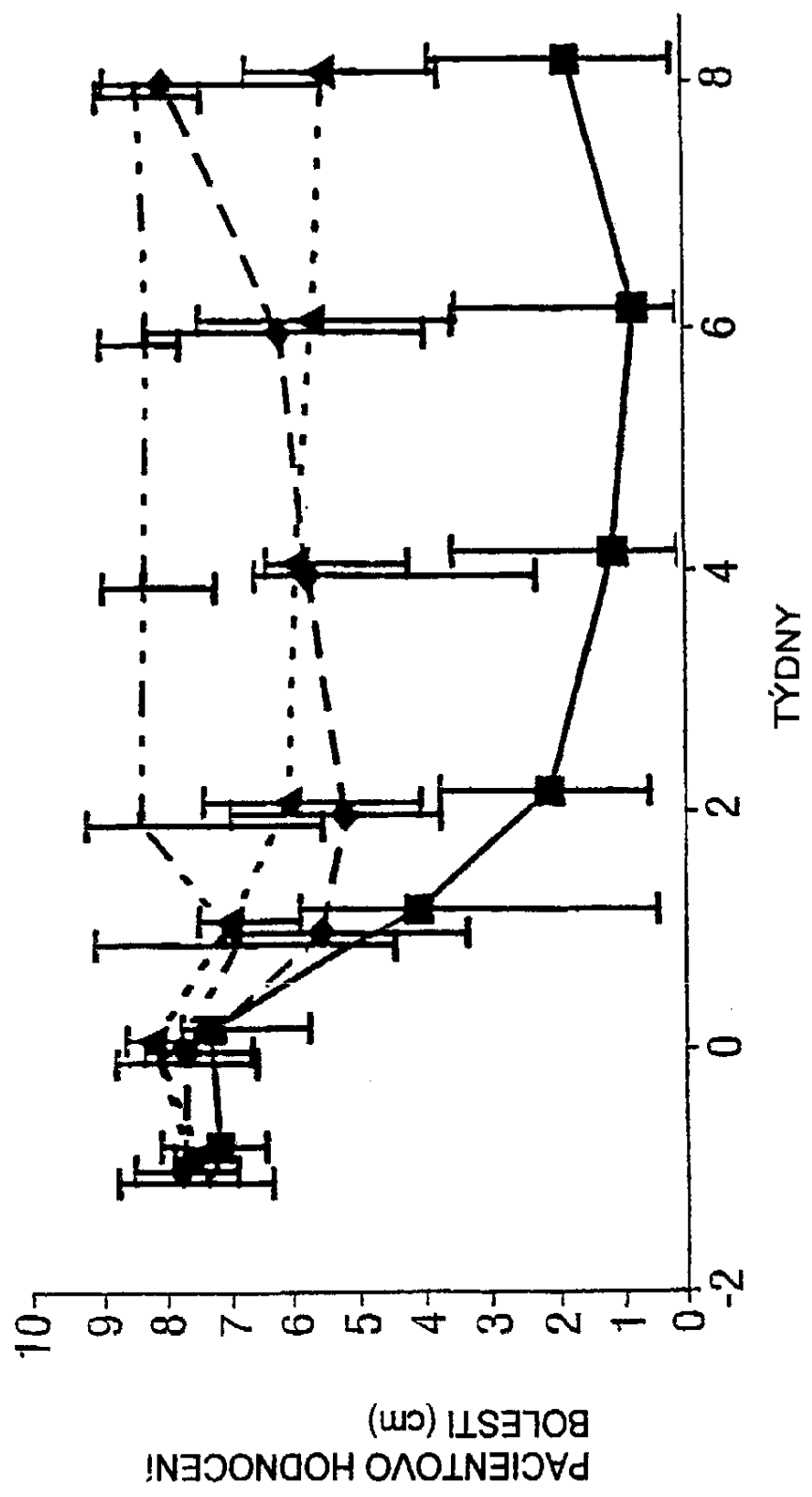
Obr. 24 (pokrač.)



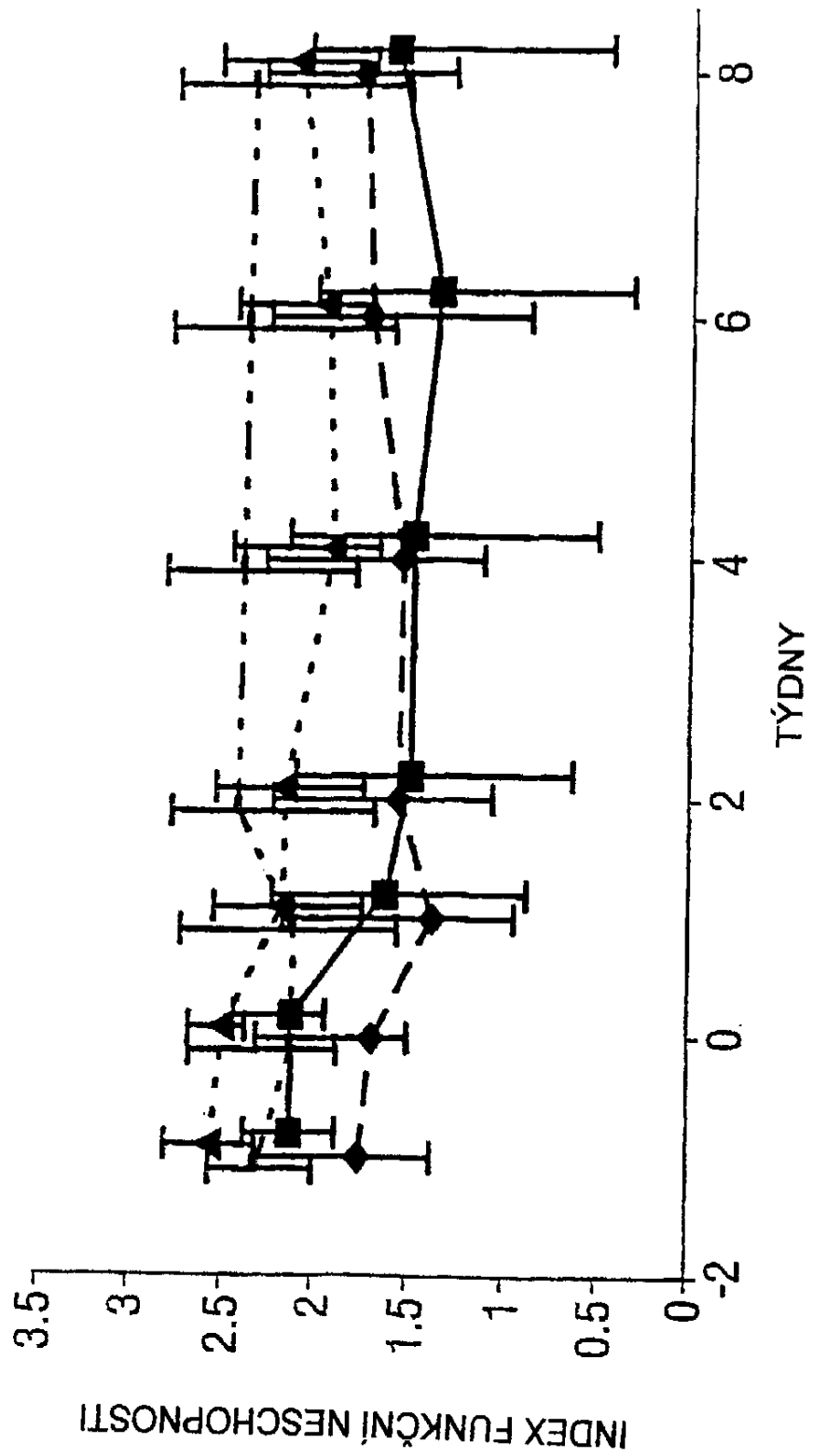
Obr. 24 (pokrač.)



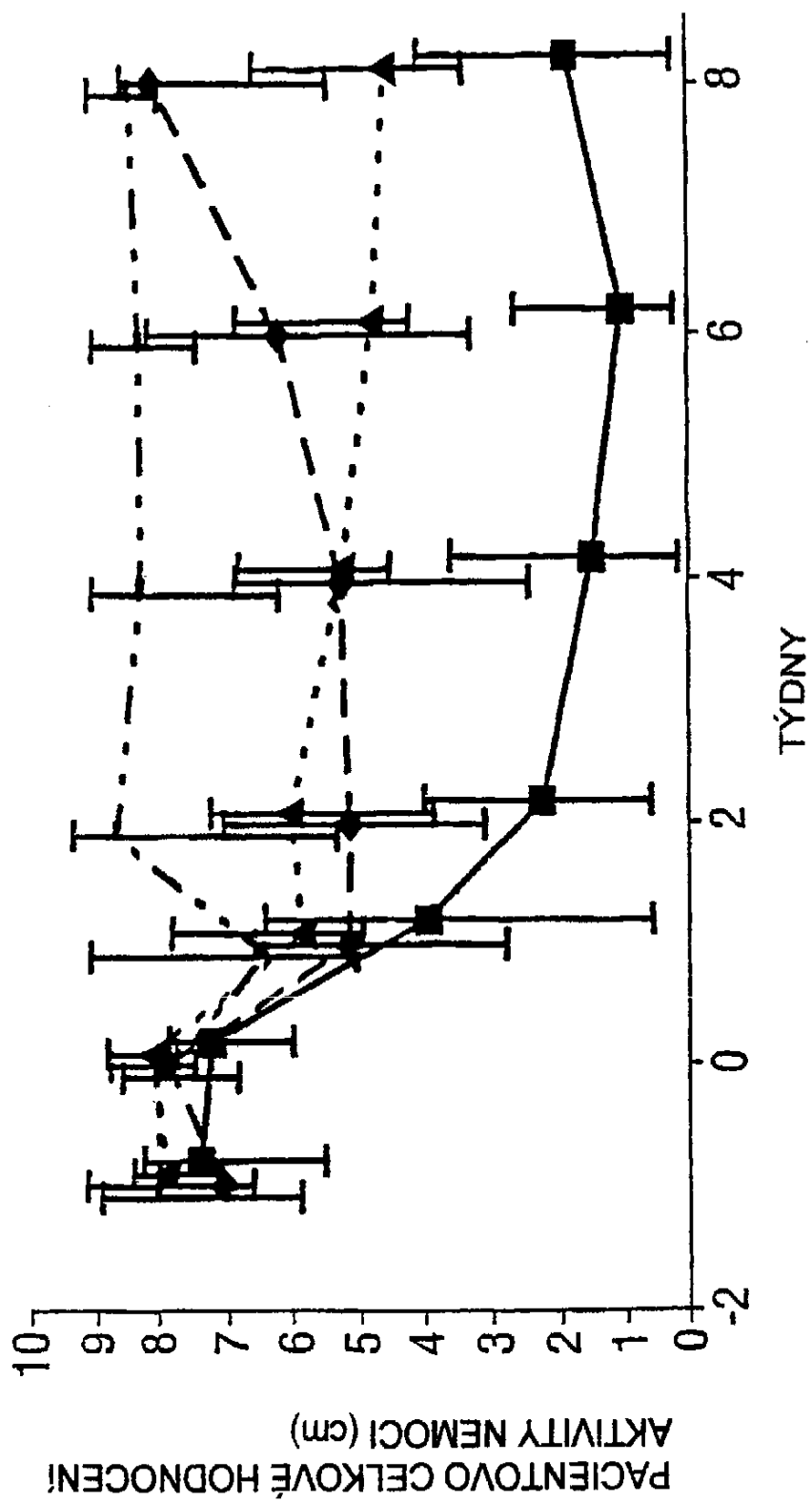
Obr. 24 (pokrač.)



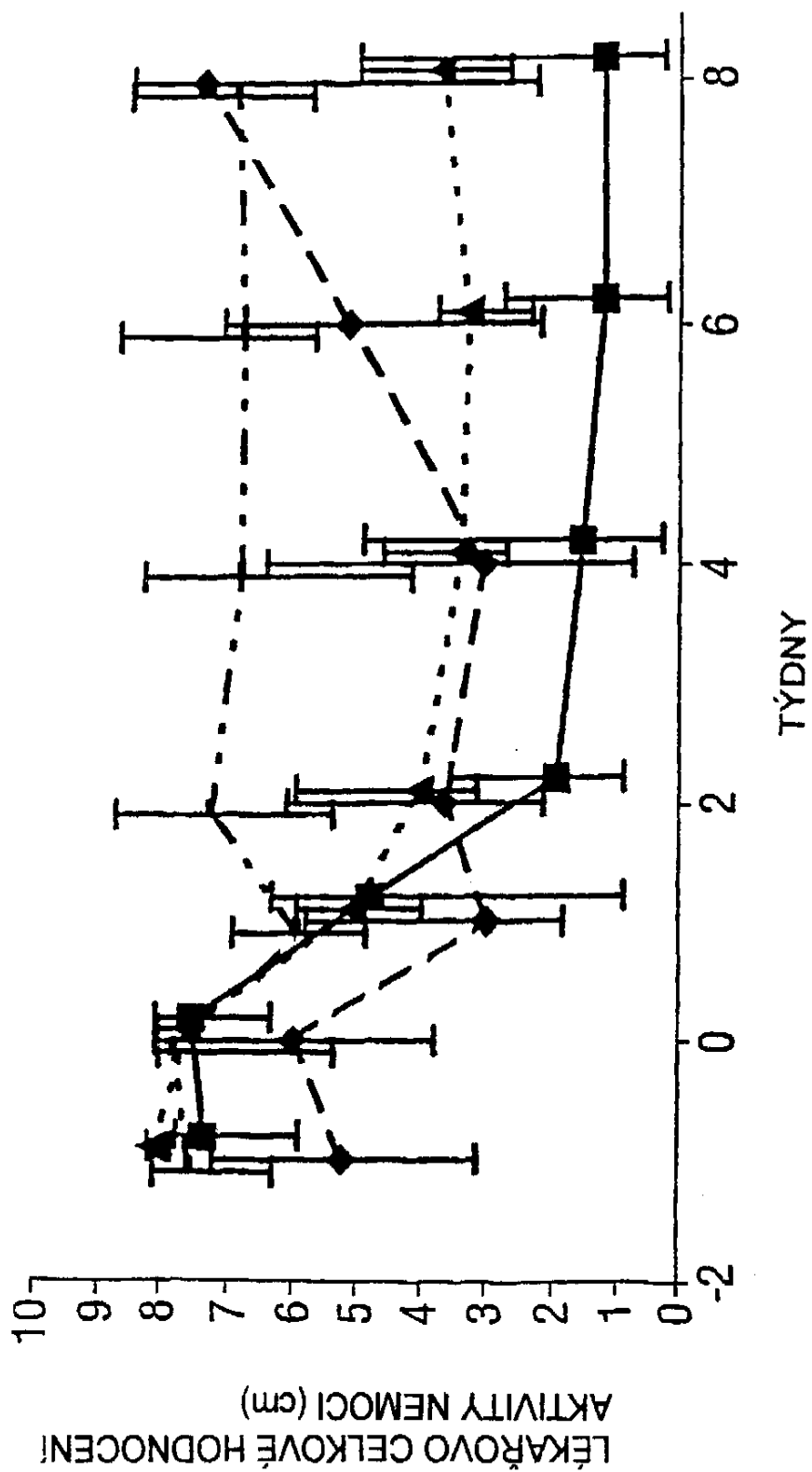
Obr. 24 (pokrač.)



Obr. 24 (pokrač.)



Obr. 24 (pokrač.)



Konec dokumentu