



(12) PATENT

(19) NO

(11) 341218

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20160694	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.06.05 PCT/GB2001/002477
(22)	Inng.dag	2016.04.26	(85)	Videreføringsdag	2016.04.26
(24)	Løpedag	2001.06.05	(30)	Prioritet	2000.06.06, GB, 0013810.7
(41)	Alm.tilgj	2002.04.08			
(45)	Meddelt	2017.09.11			
(62)	Avdelt fra	20131316, med inndato 2013.10.01			
(73)	Innehaver	UCB Pharma S.A., Allée de Recherche 60, BE-1070 BRUSSEL, Belgia			
(72)	Oppfinner	David John King, 1744 Terrace Drive, US-CA94002 BELMONT, USA Diljeet Singh Athwal, 208 Bath Road, GB-SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Derek Thomas Brown, 208 Bath Road, GB-SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Andrew Neil Charles Weir, 208 Bath Road, GB-SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Andrew George Popplewell, 208 Bath Road, GB-SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Andrew Paul Chapman, 208 Bath Road, GB-SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Antistoffmolekyl med spesifisitet for human tumornekrosefaktor-alfa, DNA, klonings- og ekspresjonsvektor, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av antistoffmolekylet samt terapeutisk preparat			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9825971 A WO 9211383 A WO 9964460 A EP 0380068 A1 STEPHENS S. et al., Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses, Immunology, august 1995, Vol 85, s. 668-674			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår et antistoffmolekyl med spesifisitet for human TNF α , og angår også DNA sekvenser som koder for kjedene til antistoffmolekylet, vektorer, transformerte vertceller, fremgangsmåte for fremstilling av antistoffmolekylet, et terapeutisk/diagnostisk preparat samt anvendelser av antistoffmolekylet for behandling av sykdommer mediert ved TNF α .

Foreliggende oppfinnelse vedrører et antistoffmolekyl med spesifisitet for antigeniske determinanter av human tumor nekrosefaktor-alfa (TNF α).

Foreliggende oppfinnelse vedrører også DNA som koder for antistoffet, klonings- og ekspresjonsvektor som inneholde nevnte DNA, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av antistoffmolekylet samt terapeutisk preparat som omfatter antistoffmolekylet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører antistoffmolekyler. I et antistoffmolekyl er det to tunge kjeder og to lette kjeder. Hver tunge kjede og hver lette kjede har et variabelt domene i sin N-terminale ende. Hvert variable domene omfatter fire ramme ("framework") regioner (FRer) som alternerer med tre hypervariable områder ("complementarily determining regions") (CDRer). Restene i de variable domener er konvensjonelt nummerert i henhold til et system som er tenkt ut av Kabat *et al.* Dette system er fremsatt i Kabat *et al.*, 1987, i Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (heretter "Kabat *et al. (supra)*"). Dette nummereringssystem anvendes i den foreliggende søknad dersom annet ikke er indikert.

Kabat-restangivelsene svarer ikke alltid direkte til den lineære nummerering av aminosyrerestene. Den reelle lineære aminosyresekvens kan inneholde færre eller ytterligere aminosyrer enn i den strenge Kabatnummerering tilsvarende en forkortning av eller insersjon inn i en strukturell komponent, enten ramme eller CDR, av den grunnleggende variable domenestrukturen. Den korrekte Kabatnummerering av rester kan bestemmes for et gitt antistoff ved å oppstille rester med homologi i sekvensen til antistoffet med en "standard" Kabatnummerert sekvens.

CDRene til tung kjede variabel domenet er lokalisert i rester 31-35 (CDRH1), rester 50-65 (CDRH2) og rester 95-102 (CDRH3) i henhold til Kabatnummereringen.

30

CDRene til lett kjede variabel domenet er lokalisert i rester 24-34 (CDRL1), rester 50-56 (CDRL2) og rester 89-97 (CDRL3) i henhold til Kabatnummerering.

Konstruksjon av CDR-podete antistoffer beskrevet i Europeisk patentsøknad EP-A-0239400, som omhandler en fremgangsmåte hvor CDRene til et monoklonalt museantistoff er podet på rammeregionene av de variable domene av et humant immunoglobulin ved seterrettet mutagenese ved anvendelse av lange oligonukleotider. CDRene bestemmer antigenbindingsspesifisiteten til antistoffer

og er relativt korte peptidsekvenser som bæres på rammeregionene til de variable domener.

Det tidligste arbeid om humanisering av monoklonale antistoffer ved CDR-poding ble gjennomført på monoklonale antistoffer som gjenkjenner syntetiske antigener, som NP. Eksempler hvor et monoklonalt museantistoff som gjenkjenner lysozym og et monoklonalt rotteantistoff som gjenkjenner et antigen på humane T-celler ble humanisert ved CDR-poding er imidlertid blitt beskrevet av Verhoeven *et al.* (Science, 239, 1534-1536, 1988) og Riechmann *et al.* (Nature, 332, 323-324, 10 1988).

Riechmann *et al.* fant at overføring av CDRe ne alene som definert av Kabat (Kabat *et al.* (*supra*) og Wu *et al.*, J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970) var ikke tilstrekkelig til å tilveiebringe tilfredsstillende antigen bindingsaktivitet i det CDR-15 podede produkt. Det ble funnet at en rekke av rammerester måtte endres slik at de svarer til dem i donor-rammeregenen. De foreslåtte kriterier for å selektere hvilke rammerester som måtte endres er beskrevet i internasjonal patentsøknad WO 90/07861.

20 En rekke tidsskrifter som omtaler CDR-podete antistoffer har blitt publisert, inkluderende Vaughan *et al.* (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

TNF α er et pro-inflammatorisk cytokin som frigis ved og interagerer med celler i immunsystemet. Således frigis TNF α ved makrofager som er blitt aktivert ved 25 lipopolysakkarider (LPS) av gram-negative bakterier. Som sådan, synes TNF α å være en endogen mediator av sentral viktighet involvert i utviklingen og patogenesen av endotoksisk sjokk assosiert med bakteriell sepsis. TNF α er også blitt vist til å være oppregulert i en rekke humane sykdommer, som inkluderer kroniske sykdommer som reumatoid artritt, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt og 30 multippel sklerose. Mus som er transgene for human TNF α produserer høye nivåer av TNF α konstitutivt og utvikler en spontan, destruktiv polyartritt som ligner reumatoid artritt (Kaffer *et al.*, EMBO J., 10, 4025-4031, 1991). TNF α er derfor omtalt som et pro-inflammatorisk cytokin.

35 Monoklonale antistoffer mot TNF α er tidligere blitt beskrevet. Meager *et al.*, (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) beskriver murine monoklonale antistoffer mot rekombinant TNF α . Fendly *et al.*, (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) beskriver anvendelse av murine monoklonale antistoffer mot rekombinant TNF α for å

definere nøytraliserende epitoper på TNF α . Shimamoto *et al.*, (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) beskriver anvendelse av murine monoklonale antistoffer mot TNF γ og deres anvendelse for å forhindre endotoksisk sjokk i mus. Videre, i internasjonal patentsøknad WO 92/11383, er rekombinante antistoffer, 5 inkluderende CDR-podete antistoffer, spesifikke for TNF α , omtalt. Rankin *et al.*, (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) beskriver anvendelse av slike CDR-podete antistoffer i behandling av reumatoid artritt. US-A-5 919 452 omhandler anti-TNF kimære antistoffer og deres anvendelse for å behandle patologier assosiert med tilstedeværelsen av TNF.

10

Antistoffer overfor TNF α er blitt foreslått for profylakse og behandling av endotoksisk sjokk (Beutler *et al.*, Science, 234, 470-474, 1985). Bodner *et al.*, (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) og Wherry *et al.*, (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) omtaler det terapeutiske potensiale hos anti- 15 TNF α antistoffer i behandling av septisk sjokk. Bruk av anti-TNF α antistoffer i behandlingen av septisk sjokk er også omtalt av Kirschenbaum *et al.*, (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). Kollagen-indusert artritt kan behandles effektivt ved anvendelse av et anti-TNF α monoklonalt antistoff (Williams *et al.* (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992).

20

Økte nivåer av TNF α er funnet i både synovialvæsken og i perifert blod hos pasienter som lider av reumatoid artritt. Når TNF α -blokkerende midler administreres til pasienter som lider av reumatoid artritt, reduserer de inflammasjon, forbedrer symptomer og retarderer leddskade (McKown *et al.* 25 (Arthritis Rheum., 42, 1204-1208, 1999).

Bruk av anti-TNF α antistoffer i behandlingen av reumatoid artritt og Crohns sykdom er omtalt i Feldman *et al.*, (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini *et al.*, (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) og i 30 Feldman *et al.*, (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Antistoffene overfor TNF α som anvendes i slike behandlinger er generelt kimære antistoffer, som dem beskrevet i US-A-5 919 452.

To TNF α blokkerende produkter er nå tillatt for behandling av reumatoid artritt. Det 35 første, betegnet etanercept, er markedsført av Immunex Corporation som Enbrel. Det er et rekombinant fusjonsprotein som omfatter to p75 oppløselige TNF-reseptor domener koblet til Fc delen av et humant immunoglobulin. Det andre, betegnet infliksimab, er markedsført av Centocor Corporation som Remicade. Det

er et kimært antistoff med murine anti-TNF α variable domener og humane IgG1 konstante domener.

De tidligere kjente rekombinante anti-TNF α antistoffmolekyler har generelt en
 5 redusert affinitet for TNF α sammenlignet med antistoffene hvorfra de variable regioner eller CDRe er avledet, de må generelt fremstilles i pattedyrceller og er kostbare å produsere. Tidligere kjente anti-TNF α antistoffer er beskrevet i Stephens *et al.*, (Immunology, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570 og GB-A-2 297 145.

10

STEPHENS S. *et al* beskriver et humanisert anti-TNF α antistoff (CDP571) avledet fra det murine antistoff CB0010 med en halveringstid på omtrent 13 dager og redusert immunogenitet som er egnet for gjentatt terapi.

15 Der er et behov for et antistoffmolekyl for å behandle kroniske inflammatoriske sykdommer som kan anvendes gjentagende og som kan fremstilles enkelt og effektivt. Der er også et behov for et antistoffmolekyl med en høy affinitet for TNF α og lav immunogenitet i mennesker.

20 Den foreliggende oppfinnelse vedrører et antistoffmolekyl som har spesifisitet for human TNF α , som er et Fab-fragment, som omfatter en lett kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:113 og en tung kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:111.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et antistoffmolekyl som har spesifisitet for
 25 human TNF α , som er et Fab-fragment, som har en lett kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:113 og en tung kjede som har sekvensen angitt i SEKV ID NR:111.

Det er tilveiebrakt et antistoffmolekyl med spesifisitet for TNF α , omfattende en tung kjede hvor det variable domene omfatter et CDR (som definert av Kabat *et al.*,
 30 (*supra*)) med sekvensen gitt som H1 i figur 3 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, som H2' i figur 3 (SEQ ID NO:2) eller som H2 i figur 3 (SEQ ID NO:7) for CDRH2 eller som H3 figur 3 (SEQ ID NO:3) for CDRH3.

Antistoffmolekylet omfatter minst ett CDR valgt fra H1, H2' eller H2 og H3 (SEQ ID
 35 NO:1, SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:7 og SEQ ID NO:3) for tung kjede variabel domenet. Foretrukket omfatter antistoffmolekylet minst to og foretrukket alle tre CDRe i tung kjede variabel domenet.

Det er tilveiebrakt et antistoffmolekyl med spesifisitet for human TNF α , omfattende en lett kjede hvor det variable domenet omfatter et CDR (som definert av Kabat *et al.*, (*supra*)) med sekvensen gitt som L1 i figur 3 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, L2 i 5 figur 3 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 eller L3 i figur 3 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

Antistoffmolekylet omfatter minst ett CDR valgt fra L1, L2 og L3 (SEQ ID NO:4 til SEQ ID NO:6) for lett kjede variabel domenet. Antistoffmolekylet omfatter foretrukket minst to og mer foretrukket alle tre CDRer i lett kjede variabel domenet. 10

Antistoffmolekylene har henholdsvis en komplementær lett kjede eller en komplementær tung kjede.

Antistoffmolekylene omfatter en tung kjede hvor det variable domenet omfatter et 15 CDR (som definert av Kabat *et al.*, (*supra*)) med sekvensen gitt som H1 i figur 3 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, som H2' eller H2 i figur 3 (SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:7) for CDRH2 eller som H3 i figur 3 (SEQ ID NO:3) for CDRH3 og en lett kjede hvor det variable domenet omfatter et CDR (som definert av Kabat *et al.*, (*supra*)) med sekvensen gitt som L1 in figur 3 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, som L2 i figur 3 20 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 eller som L3 i figur 3 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

CDRene gitt i SEQ ID NO:1 og 3 til 7 og i figur 3 som omtalt over er avledet fra et mus-monoklonalt antistoff hTNF40. SEQ ID NO:2 består imidlertid av et hybrid CDR. Hybrid CDRet omfatter en del av tung kjede CDR2 fra monoklonalt muse- 25 antistoff hTNF40 (SEQ ID NO:7) og en del av tung kjede CDR2 fra en human gruppe 3 germline V region sekvens.

De fullstendige sekvenser av de variable domener i mus hTNF40 antistoffet er vist i figur 6 (lett kjede) (SEQ ID NO:99) og figur 7 (tung kjede) (SEQ ID NO:100). 30 Dette museantistoff er i det etterfølgende omtalt som "donor antistoffet".

Det monoklonale museantistoff hTNF40 med lett og tung kjede variabel domenesekvensene vist i henholdsvis figur 6 (SEQ ID NO:99) og figur 7 (SEQ ID NO:100) er beskrevet. Lett kjede konstant regionen av hTNF40 er kappa og tung 35 kjede konstant regionen er IgG2a.

Et kimært mus/humant antistoffmolekyl, omtalt heri som det kimære hTNF40 antistoffmolekyl er beskrevet. Det kimære antistoffmolekyl omfatter de variable

domener til det monoklonale museantistoff hTNF40 (SEQ ID NO:99 og 100) og humane konstante domener. Det primære hTNF40 antistoffmolekyl omfatter foretrukket det humane C kappa domenet (Hieter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; Genbank aksesjonsnummer J00241) i den lette kjede og de humane gamma 4 domener (Flanagan *et al.*, Natur, 300, 709-713, 1982) i den tunge kjede.

Et CDR-podet antistoffmolekyl er beskrevet. Betegnelsen "et CDR-podet antistoffmolekyl" som anvendt heri refererer til et antistoffmolekyl hvor den tunge og/eller lette kjede inneholder ett eller flere CDRer (inkluderende, om ønsket, et hybrid CDR) fra donor antistoffet (for eksempel et murint monoklonalt antistoff) podet inn i en tung og/eller lett kjede variabel region ramme til et akseptorantistoff (for eksempel et humant antistoff).

Et slikt CDR-podet antistoff har foretrukket et variabelt domene omfattende humane akseptor-ramme regioner så vel som en eller flere av donor CDRe omalt over.

Når CDRe er podet, kan en hvilken som helst passende akseptor variabel region rammesekvens anvendes under hensyntagen til klassen/typen av donorantistoffet hvorfra CDRe er avledet, inkluderende rammeregioner fra mus, primater og mennesker. Eksempler på humane rammer som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse er KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY og POM (Kabat *et al. (supra)*). KOL og NEWM kan for eksempel anvendes for den tunge kjede, REI kan anvendes for den lette kjede og EU, LAY og POM kan anvendes for både den tunge og den lette kjede. De foretrukne rammeregioner for den lette kjede er de humane gruppe 1 rammeregioner vist i figur 1 (SEQ ID NO:83, 85, 87 og 89). De foretrukne rammeregioner for den tunge kjede er de humane gruppe 1 og gruppe 3 rammeregioner vist i figur 2 (SEQ ID NO:91, 93, 95 og 97 og SEQ ID NO:106, 107, 108 og 109), respektivt.

30

I et CDR-podet antistoff er det fortrukket å anvende, som akseptor og antistoff, ett med kjeder som er homologe med kjedene til donorantistoffet. Akseptor tunge og lette kjeder behøver nødvendigvis ikke være avledet fra det samme antistoffet og kan, om ønsket, omfatte komposittkjeder med rammeregioner avledet fra forskjellige kjeder.

I et CDR-podet antistoff behøver heller ikke rammeregionene å ha nøyaktig den samme sekvens som akseptorantistoffet. Vanlige rester kan for eksempel være

byttet til mere hyppig forekommende rester for denne akseptorkjede-klasse eller -type. Valgt rester i akseptor-rammeregioner kan alternativt forandres slik at de svarer til resten funnet i den samme posisjon i donorantistoffet. Slike forandringer bør holdes på det minimum som er nødvendig for å gjenvinne affiniteten av
5 donorantistoffet. En protokoll for å selekttere rester i akseptor-rammeregionene som eventuelt må forandres er fremsatt i WO 91/09967.

I et CDR-podet antistoffmolekyl, dersom akseptor-tungkjeden har human gruppe 1 rammeregioner (vist i figur 2) (SEQ ID NO:91, 93, 95 og 97), da omfatter akseptor-
10 rammeregionene til den tunge kjede foretrukket, i tillegg til ett eller flere donor CDRer, donorrester i stillingene 28, 69 og 71 (i henhold til Kabat *et al.* (*supra*)).

Dersom akseptor-tungkjeden har gruppe 1 rammeregioner, da omfatter akseptor-rammeregionen til den tunge kjede alternativt, i tillegg til ett eller flere donor
15 CDRer, donorrester i stillingene 28, 38, 46, 67, 69 og 71 (i henhold til Kabat *et al.* (*supra*)).

Foretrukket, i et CDR-podet antistoffmolekyl, dersom akseptor-tungkjeden har human gruppe 3 rammeregioner (vist i figur 2) (SEQ ID NO:106, 107, 108 og 109),
20 da omfatter akseptor-rammeregionene til den tunge kjede, i tillegg til ett eller flere donor CDRer, donorrester i stillinger 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 og 78 (i henhold til Kabat *et al.* (*supra*)).

I et CDR-podet antistoffmolekyl, dersom akseptor-lettkjeden har humane gruppe 1
25 rammeregioner (vist i figur 1) (SEQ ID NO:83, 85, 87 og 89) da omfatter foretrukket akseptor-rammeregionene til den lette kjede donorrester i stillingene 46 og 60 (i henhold til Kabat *et al.* (*supra*)).

Donorrester er rester fra donorantistoffet, dvs. antistoffer hvorfra CDRene
30 opprinnelig ble avledet.

Det er beskrevet et fullstendig antistoffmolekyl med full lengde tunge og lette kjeder, et fragment derav, slik som et Fab, modifisert Fab, Fab', F(ab')₂ eller Fv fragment, en lett kjede eller tung kjede monomer eller dimer, et enkelt kjede
35 antistoff, for eksempel et enkelt kjede Fv hvor tung og lett kjede variabel domenene er forbundet ved hjelp av en peptidlinker. Likeledes kan tung og lett kjede variabel regionene være kombinert med andre antistoffdomener som passende.

Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen er et Fab fragment. Fab fragmentet har en tung kjede med sekvensen gitt som SEQ ID NO:111 og en lett kjede med sekvensen gitt som SEQ ID NO:113. Aminosyresekvensen gitt i SEQ ID NO:111 og SEQ ID NO:113 er foretrukket kodet for av nukleotidsekvensene gitt i henholdsvis SEQ ID NO:110 og SEQ ID NO:112.

Det er foretrukket at antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen er et modifisert Fab fragment hvor modifikasjonen er addisjonen til den C-terminale ende av dets tunge kjede, en eller flere aminosyrer for å tillate festingen av et effektor- eller reportertermolekyl. De ytterligere aminosyrer danner foretrukket en modifisert hengselregion inneholdende en eller to cysteinrester hvortil effektor eller reportertermolekylet kan være festet. Et slikt modifisert Fab fragment har foretrukket en tung kjede med sekvensen gitt som SEQ ID NO:115 og den lette kjede med sekvensen gitt som SEQ ID NO:113. Aminosyresekvensen gitt i SEQ ID NO:115 er foretrukket kodet for av nukleotidsekvensen gitt i SEQ ID NO:114.

En foretrukket effektorgruppe er et polymermolekyl som kan være festet til det modifiserte fragment for å øke dets halveringstid *in vivo*.

Polymermolekylet kan generelt være en syntetisk eller naturlig forekommende polymer, for eksempel en eventuelt substituert rettkjedet eller forgrenet polyalkylen-, polyalkenylen- eller polyoksyalkylenpolymer eller et rettkjedet er forgrenet polysakkarid, for eksempel et homo- eller heteropolysakkarid.

Spesielle eventuelle substituenten som kan være tilstede i de ovennevnte syntetiske polymerer inkluderer en eller flere hydrokso-, metyl- eller metoksygrupper. Særlige eksempler på syntetisk polymerer inkluderer eventuelt substituert rettkjedet eller forgrenet poly(etylenglykol), poly(propylenglykol), poly(vinylalkohol) eller derivater derav, særlig eventuelt substituert poly(etylenglykol) som metoksy-poly(etylenglykol) eller derivater derav. Særlige naturlig forekommende polymerer inkluderer laktose, amylose, dekstran, glykogen eller derivater derav. "Derivater" som anvendt heri skal inkludere reaktive derivater, for eksempel tiol-selektive reaktive grupper som maleimider og lignende. Den reaktive gruppe kan være koblet direkte eller gjennom et koblingssegment til polymeren. Det vil forstås at resten i en slik gruppe i noen tilfeller vil utgjøre en del av produktet som koblingsgruppen mellom antistoff-fragmentet og polymeren.

Størrelsen på polymeren kan om ønsket varieres, men vil generelt være i et gjennomsnittlig molekylvektområde fra 500Da til 50000Da, foretrukket fra 5000 til 40000Da, mer foretrukket fra 25000 til 40000Da. Polymerstørrelsen kan særlig velges på grunnlag av produktets tilsiktede anvendelse. Således, der produktene

5 skal forlate sirkulasjonen og penetrere vev, for eksempel for anvendelse i behandling av en tumor, kan det for eksempel være fordelaktig å anvende en polymer med liten molekylvekt, for eksempel med en molekylvekt på omtrent 5000Da. For anvendelse hvor produktet forblir i sirkulasjonen, kan det være fordelaktig å anvende en polymer med høyere molekylvekt, for eksempel med en

10 molekylvekt i området fra 25000Da til 40000Da.

Særlig foretrukne polymerer inkluderer en polyalkylenpolymer, som en poly(etylenglykol) eller særlig en metoksy-poly(etylenglykol) eller et derivat derav, og særlig med en molekylvekt i området fra omtrent 25000Da til omtrent 40000Da.

15

Hvert polymermolekyl festet til det modifiserte antistoff-fragment kan være kovalent bundet til svovelatomet i en cysteinrest lokalisert i fragmentet. Den kovalente binding vil generelt være en disulfidbinding eller særlig en svovel-karbonbinding.

20 Om ønsket kan antistoff-fragmentet ha en eller flere effektor- eller reporter-molekyler festet dertil. Effektor- eller reporter-molekylene kan være festet til antistoff-fragmentet gjennom en hvilken som helst tilgjengelig aminosyre sidekjede eller en terminal aminosyre-funksjonell gruppe lokalisert i fragmentet, for eksempel en hvilken som helst fri amino-, imino-, hydroksyl- eller karboksylgruppe.

25

En aktivert polymer kan anvendes som utgangsmaterialet for fremstilling av polymermodifiserte antistoff-fragmenter som beskrevet over. Den aktiverte polymer kan være en hvilken som helst polymer som inneholder en tiol-reaktiv gruppe som en α -halokarboksytsyre eller ester, for eksempel jodacetamid, et imid, for eksempel

30 maleimid, et vinylsulfon eller et disulfid. Slike utgangsmaterialer kan oppnås kommersielt (for eksempel fra Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) eller kan fremstilles fra kommersielt tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av konvensjonelle kjemiske prosedyrer.

35 Med hensyn til poly(etylenglykol) (PEG) enhetene for festing, vises det til "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry og Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American

Chemical Society, Washington DC og "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam og A. Dent, Grove Publishers, New York.

- 5 Når det er ønskelig å oppnå et antistoff-fragment koblet til et effektor- eller reporter-molekyl, kan dette fremstilles ved standard kjemiske eller rekombinante DNA prosedyrer hvor antistoff-fragmentet enten kobles direkte eller via et koblingsmiddel til effektor- eller reporter-molekylet, enten før eller etter reaksjon med den aktiverte polymer, som passende. Særlige kjemiske prosedyrer inkluderer for
- 10 eksempel dem beskrevet i WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 og WO 89/01476. Alternativt, der effektor- eller reporter-molekylet er et protein eller polypeptid kan koblingen oppnås ved anvendelse av rekombinante DNA prosedyrer, for eksempel som beskrevet i WO 86/01533 og EP-A-0392745.
- 15 Det modifiserte Fab fragmentet ifølge oppfinnelsen er foretrukket PEGylert (det vil si har PEG (poly(etylenglykol)) kovalent bundet dertil) i henhold til metoden omtalt i EP-A-0948544. Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen er foretrukket et PEGylert modifisert Fab fragment som vist i figur 13. Som vist i figur 13, har det modifiserte Fab fragment en maleimidgruppe kovalent bundet til en enkelt tiolgruppe i en
- 20 modifisert hengselregion. En lysinrest er kovalent bundet til maleimidgruppen. Til hver av aminogruppene på lysinresten er en metoksy-poly(etylenglykol)-polymer med en molekylvekt på omtrent 20000 Da bundet. Den totale molekylvekt for hele effektormolekylet er derfor omtrent 40000 Da.
- 25 I forbindelsen vist i figur 13 har den tunge kjeden til antistoffdelen foretrukket sekvensen gitt som SEQ ID NO:115 og den lette kjeden har sekvensen gitt i SEQ ID NO:113. Denne forbindelse er foretrukket omtalt heri som CDP870.
- Konstant region domeneene for antistoffmolekylet, om tilstede, kan velges med
- 30 hensyn til den foreslåtte funksjon for antistoffmolekylet, og særlig effektor-funksjonene som kan være påkrevd. Konstant region domeneene kan for eksempel være human IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM domener. Human IgG konstant region domener kan særlig anvendes, særlig av IgG1 og IgG3 isotypene når antistoff-molekylet er tiltenkt for terapeutiske anvendelser og hvor antistoff-
- 35 effektorfunksjoner er påkrevd. Alternativt kan IgG2 og IgG4 isotyper anvendes når antistoffmolekylet er tiltenkt for terapeutiske formål og antistoff-effektorfunksjoner ikke er påkrevd, for eksempel for kun blokkering av TNF α aktivitet.

Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen kan også ha et effektor- eller et reporter-molekyl festet dertil. Det kan for eksempel ha en makrosyklus, for å kompleksdanne et tungmetallatom, eller et toksin, som ricin, festet dertil ved hjelp av en kovalent brodannelsesstruktur. Alternativt kan prosedyrer for rekombinant DNA teknologi anvendes for å fremstille et antistoffmolekyl hvor Fc fragmentet (CH2, CH3 og hengseldomener), CH2 og CH3 domeneene eller CH3 domenet av et komplett immunoglobulinmolekyl er blitt erstattet med, eller har festet dertil ved hjelp av en peptidkobling, et funksjonelt ikke-immunoglobulinprotein, slik som et enzym eller toksinmolekyl.

10

Antistoffmolekylet har foretrukket en bindingsaffinitet på minst $0,85 \times 10^{-10} \text{M}$, mer foretrukket minst $0,75 \times 10^{-10} \text{M}$ og mest foretrukket minst $0,5 \times 10^{-10} \text{M}$. (Det skal bemerkes at det foretrukne humaniserte antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen som beskrevet under, har en affinitet på omtrent $0,5 \times 10^{-10} \text{M}$ som er bedre enn affiniteten til det murine monoklonale antistoff hvorfra det er avledet. Det murine antistoff har en affinitet på omtrent $0,85 \times 10^{-10} \text{M}$.)

Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen omfatter foretrukket lett kjede variabel domenet hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8) og tung kjede variabel domenet gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11). Sekvensene til de variable domener av disse lette og tunge kjeder er vist i henholdsvis figur 8 og 11.

Varianter av antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen er også beskrevet, som har en forbedret affinitet for $\text{TNF}\alpha$. Slike varianter kan oppnås ved en rekke affinitetsmaturitetsprotokoller som inkluderer mutering av CDRene (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), kjede-"shuffling" (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), anvendelse av mutator stammer av *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), DNA stokking" (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), "phage display" (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) og seksuell PCR (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) omtaler disse metoder for affinitetsmaturering.

35

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en DNA sekvens som koder for den tunge og/eller lette kjeden til antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen.

DNA sekvensen koder foretrukket for den tunge eller den lette kjeden til antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen.

En DNA sekvens som koder for en lett kjede og omfatter sekvensen vist i SEQ ID NO:8 (hTNF40-gL1) eller SEQ ID NO:9 (hTNF40-gL2) eller en degenerasjons-ekvivalent derav er beskrevet.

- 5 En DNA sekvens som koder for en tung kjede og omfatter sekvensen vist i SEQ ID NO:10 (gh1hTNF40.4) eller SEQ ID NO:11 (gh3hTNF40.4) eller en degenerasjonsekvivalent derav er en foretrukket utførelse.

DNA sekvensen ifølge oppfinnelsen kan omfatte syntetisk DNA, for eksempel fremstilt ved kjemisk prosessering, cDNA, genomisk DNA eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også en klonings- eller ekspresjonsvektor omfattende en eller flere DNA sekvenser ifølge oppfinnelsen. Klonings- eller ekspresjonsvektoren omfatter foretrukket to DNA sekvenser, som henholdsvis koder for den lette kjede og den tunge kjede til antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen.

I en foretrukket utførelse tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en *E. coli* ekspresjonsvektor omfattende en DNA sekvens ifølge oppfinnelsen. Ekspresjonsvektoren er foretrukket pTTO(CDP870) som vist skjematisk i figur 22.

Vektor pDNA_{Eng-G1} er vist i figur 19.

25 Generelle metoder hvorved vektorene kan konstrueres, transfeksjonsmetoder og dyrkingsmetoder er velkjent for fagkyndige på området. I denne forbindelse vises det til "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

30

DNA sekvenser som koder for antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen kan oppnås med metoder som er velkjent for fagkyndig på området. DNA sekvenser som for eksempel koder for noen eller alle av antistoffets tunge og lette kjeder kan syntetiseres som ønsket fra de bestemte DNA sekvenser eller på grunnlag av de tilsvarende aminosyresekvenser.

35

DNA som koder for akseptor rammesekvenser er omfattende tilgjengelig for fagkyndig på området og kan lett syntetiseres på basis av deres kjente aminosyresekvenser.

- 5 Standard teknikker innen molekylærbiologi kan anvendes for å fremstille DNA sekvensen som koder for antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen. Ønskede DNA sekvenser kan syntetiseres fullstendig eller delvis ved anvendelse av oligonukleotid synteseteknikker. Sete-rettet mutagenese og polymerase-kjede-reaksjon (PCR) teknikker kan passende anvendes.

10

Et hvilket som helst passende vertscelle/vektorsystem kan anvendes for ekspresjon av DNA sekvensene som koder for antistoffmolekylene. Bakterielle, for eksempel *E. coli*, og andre mikrobielle systemer kan tildels anvendes for ekspresjon av antistoff-fragmenter som Fab og F(ab')₂ fragmenter og særlig Fv
15 fragmenter og enkeltkjede-antistoff-fragmenter, for eksempel enkeltkjede Fver. Eukaryotiske, for eksempel pattedyr, vertscelle-ekspresjonssystemer kan anvendes for fremstilling av større antistoffmolekyler, som inkluderer fullstendige antistoffmolekyler. Passende pattedyr-vertsceller inkluderer CHO, myelom- eller hybridomceller.

20

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen som omfatter dyrking av en vertscelle som inneholder en vektor ifølge oppfinnelsen under betingelser som er egnet for å føre
25 til ekspresjon av protein fra DNA som koder for antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen, og isolere antistoffmolekylet.

Fremgangsmåten for fremstilling av antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen omfatter foretrukket dyrking av *E. coli* som inneholder en *E. coli* ekspresjonsvektor omfattende DNA sekvensen ifølge oppfinnelsen under betingelser egnet til å føre
30 til ekspresjon av protein fra DNA sekvensen og isolering av antistoffmolekylet. Antistoffmolekylet kan utskilles fra cellen eller målrettes til periplasmaet ved passende signalsekvenser. Alternativt kan antistoffmolekylene akkumulere i cellens cytoplasma. Antistoffmolekylet målrettes foretrukket til periplasmaet. Avhengig av det antistoffmolekyl som produseres og den anvendte
35 fremgangsmåte, er det ønskelig å la antistoffmolekylene re-folde seg og innta en funksjonell konformasjon. Prosedyrer for å la antistoffmolekyler få re-folde seg er vel kjent for fagkyndige på området.

Antistoffmolekylet kan omfatte kun et tung eller lett kjedepolypeptid, i hvilket tilfelle kun en tung kjede eller lett kjede polypeptid-kodesequens behøver å anvendes for å transfektere vertscellene. For fremstilling av produkter som omfatter både tunge og lette kjeder, kan cellelinjen transfekteres med to vektorer, en første vektor som
5 koder for et lett kjede polypeptid og en andre vektor som koder for et tung kjede polypeptid. Alternativt kan en enkelt vektor anvendes, idet vektoren inkluderer sekvenser som koder for lett kjede og tung kjede polypeptid.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et terapeutisk eller diagnostisk
10 preparat som omfatter et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen. Antistoffmolekylet kan være i kombinasjon med en farmasøytisk akseptert eksipiens, fortynningsmiddel eller bærer.

En fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk eller diagnostisk preparat er
15 også beskrevet som omfatter blanding av antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen med en farmasøytisk akseptert eksipiens, et fortynningsmiddel eller en bærer.

Antistoffmolekylet kan være den eneste aktive bestanddel i det terapeutiske eller diagnostiske preparat eller kan være sammen med andre aktive bestanddeler som
20 inkluderer andre antistoffbestanddeler, for eksempel anti-T celle, anti-IFN γ eller anti-LPS antistoffer, eller ikke-antistoffbestanddeler som xantiner.

De farmasøytiske preparater bør foretrukket inneholde en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet ifølge oppfinnelsen. Betegnelsen "terapeutisk effektiv
25 mengde" som anvendt heri refererer til en mengde av et terapeutisk middel som er nødvendig for å behandle, forbedre eller forebygge en målsykdom eller måltilstand, eller for å utvise en detekterbar terapeutisk eller preventiv effekt. For et hvilket som helst antistoff kan en terapeutisk effektiv dose estimeres initialt i enten cellekulturanalyser eller i dyremodeller, vanligvis i gnagere, kaniner, hunder,
30 griser eller primater. Dyremodellen kan også anvendes for å bestemme det passende konsentrasjonsområdet og administreringsruten. Slik informasjon kan deretter anvendes for å bestemme anvendbare doser og ruter for administrering i mennesker.

35 Den nøyaktige effektive mengde for et menneskeindivid vil avhenge av alvorligheten av sykdomstilstanden, individets generelle helse, alder, vekt og kjønn, diett, tid og hyppighet for administrering, en eller flere legemiddelkombinasjoner, reaksjonssensitiviteter og toleranse/respons på terapi. Denne

mengde kan bestemmes ved rutineforsøk og er innenfor legens vurdering.

Generelt vil en effektiv dose være fra 0,01 mg/kg til 50 mg/kg, foretrukket fra 0,1 mg/kg til 20 mg/kg, mere foretrukket omtrent 15 mg/kg. Som vist i de etterfølgende eksempler er doser på 1,5 og 20 mg/kg blitt anvendt for å behandle pasienter som
5 lider av reumatoid artritt.

Preparater kan administreres individuelt til en pasient eller kan administreres i kombinasjon med andre midler, legemidler eller hormoner.

10 Den dose hvorved antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen administreres avhenger av naturen til den tilstand som behandles, den grad hvortil det nivå av TNF α som skal nøytraliseres er økt eller forventes og økes over et ønsket nivå, og av om antistoffmolekylet anvendes profylaktisk eller for å behandle en eksisterende tilstand.

15

Således, hvor produktet for eksempel er for behandling eller profylakse av en kronisk inflammatorisk sykdom som reumatoid artritt, ligger passende doser av antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen i området mellom 0,5 og 50 mg/kg, mer foretrukket mellom 1 og 20 mg/kg og mest foretrukket omtrent 15 mg/kg.

20 Dosehyppigheten vil avhenge av antistoffmolekylets halveringstid og varigheten av dets effekt.

Dersom antistoffmolekylet har en kort halveringstid (for eksempel 2 til 10 timer) kan det være nødvendig å gi en eller flere doser per dag. Dersom antistoffmolekylet
25 alternativt har en lengre halveringstid (for eksempel 2 til 15 dager) kan det kun være nødvendig å gi en dosering en gang per dag, per uke eller til og med en gang hver måned eller hver annen måned.

Et farmasøytisk preparat kan også inneholde en farmasøytisk akseptert bærer
30 for administrering av antistoffet. Bæreren bør i seg selv ikke indusere produksjon av antistoffer som er skadelige for individet som mottar preparatet og bør ikke være toksisk. Passende bærere kan være store, sakte metaboliserte makromolekyler som proteiner, polypeptider, liposomer, polysakkarider, polymelkesyrer, polyglykolsyrer, polymere aminosyrer, aminosyre-kopolymerer og
35 inaktive viruspartikler.

Farmasøytisk aksepterbare salter kan anvendes, for eksempel mineralsyresalter, som hydroklorider, hydrobromider, fosfater og sulfater, eller salter av organiske syrer som acetater, propionater, malonater og benzoater.

- 5 Farmasøytisk aksepterbare bærere i terapeutiske preparater kan i tillegg inneholde væsker som vann, saltoppløsning, glyserol og etanol. I tillegg kan hjelpesubstanser, som fuktemidler eller emulgeringsmidler eller pH buffer-substanser være tilstede i slike preparater. Slike bærere muliggjør utforming av de farmasøytiske preparater som tabletter, piller, drasjeer, kapsler, væsker, geler, 10 siruper, slurryer og suspensjoner for inntak derav hos pasienten.

Foretrukne former for administrering inkluderer former som er egnet for parenteral administrering for eksempel ved injeksjon eller infusjon, for eksempel bolusinjeksjon eller kontinuerlig infusjon. Når produktet er for injeksjon eller 15 infusjon, kan det være i form av en suspensjon, oppløsning eller emulsjon i en oljeaktig eller vandig vehikkel og det kan inneholde formuleringsmidler, som suspensjonsmidler, conserveringsmidler, stabiliseringsmidler og/eller dispergeringsmidler. Antistoffmolekylet kan alternativt være i tørr form for rekonstituering for anvendelse med en passende steril væske.

20

Når formulert kan preparatene ifølge oppfinnelsen administreres direkte til individet. Individene som skal behandles kan være dyr. Det er imidlertid foretrukket at preparatene er tilpasset for administrering til mennesker.

- 25 De farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan administreres ved en hvilken som helst rute som inkluderer, men som ikke er begrenset til, oral, intravenøs, intramuskulær, intra-arteriell, intramedulær, intratekal, intraventrikulær, transdermal, transkutan (se for eksempel WO98/20734), subkutan, intraperitoneal, intranasal, enteral, topisk, sublingval, intravaginal eller rektal rute. Hyposprayer 30 kan også anvendes for å administrere de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen. De terapeutiske preparater kan typisk fremstilles som injiserbare preparater, enten som flytende oppløsninger eller suspensjoner. Faste former som er egnet for oppløsning i eller suspensjon i flytende vehikler før injeksjon kan også fremstilles.

35

Direkte avlevering av preparatene vil generelt gjennomføres ved injeksjon, subkutan, intraperitoneal, intravenøs eller intramuskulær, eller ved avlevering til det interstitielle rom til et vev. Preparatene kan også administreres inn i en lesjon.

Doseringsbehandling kan være i form av et enkelt doseprogram eller et program med multiple doser.

Det vil forstås at den aktive bestanddel i preparatet vil være et antistoffmolekyl.

5 Det vil som sådan være mottagelig for nedbrytning i gastrointestinalkanalen. Således, dersom preparatet skal administreres ved en rute ved anvendelse av gastrointestinalkanalen, må preparatet inneholde midler som beskytter antistoffet mot nedbrytning, men som frigjør antistoffet straks det er blitt absorbert fra gastrointestinalkanalen.

10

En inngående omtale av farmasøytiske aksepterbare bærere er tilgjengelig i Reminton's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Man regner også med at antistoffet ifølge oppfinnelsen vil administreres ved

15 anvendelse av genterapi. For å oppnå dette, blir DNA sekvenser som koder for de tunge og lette kjeder til antistoffmolekylet under kontrollen av passende DNA komponenter innført i en pasient slik at antistoffkjedene uttrykkes fra DNA sekvensene og samles *in situ*.

20 Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et antistoffmolekyl som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment, som har spesifisitet for human TNF α for anvendelse i behandling av en akutt eller kronisk immunlidelse eller immunregulerende lidelse, en infeksjon, en neurodegenerativ sykdom eller en malign sykdom.

25

Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen kan anvendes i en hvilken som helst terapi hvor det er ønskelig å redusere nivået av biologisk aktiv TNF α tilstede i menneskekroppen eller dyrekroppen. TNF α kan sirkulere i kroppen eller være tilstede i et uønsket høyt nivå som er lokalisert på et spesielt sted i kroppen.

30

Økte nivåer av TNF α er for eksempel implisert i akutte og kroniske immunlidelser og immunregulerende lidelser, infeksjoner som inkluderer septisk, endotoksisk og kardiovaskulært sjokk, inflammatoriske lidelser, neurodegenerative sykdommer, maligne sykdommer og alkoholindusert hepatitt. Detaljer om de mange lidelser
35 som er forbundet med økte nivåer av TNF α er angitt i US-A-5 919 452. Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen kan anvendes i terapi av sykdommer mediert ved TNF α . Særlige relevante sykdommer som kan behandles ved antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen inkluderer sepsis, kongestiv hjertesvikt, septisk eller

endotoksisk sjokk, kakeksi, akutt lungesviktsyndrom, AIDS, allergier, psoriasis, TB, inflammatoriske benlidelser, blodkoagulasjonslidelser, brannsåre, avstøtningsepisoder etter organ- eller vevstransplantasjon, Crohns sykdom og autoimmune sykdommer som tyreoiditt og reumatoid artritt og osteoartritt.

5

Antistoffmolekylet eller preparatet kan i tillegg anvendes, for å redusere bivirkninger forbundet med TNF α dannelsen under neoplastisk terapi, for å eliminere eller redusere sjokk-relaterte symptomer assosiert med behandling eller forebygging av transplantatavstøtning ved anvendelse av et anti-lymfocytantistoff, eller for behandling av multi-organsvikt.

Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen anvendes foretrukket for behandling av reumatoid artritt eller osteoartritt.

15 En metode for å behandle mennesker eller dyr som lider av eller har en risiko for en lidelse mediert ved TNF α er også beskrevet, hvor metoden omfatter å administrere en effektiv mengde av antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen til individet.

20 Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen kan også anvendes i diagnose, for eksempel i *in vivo* diagnose og for å beskrive sykdomstilstander som involverer økte nivåer av TNF α .

Et antistoffmolekyl som omfatter et hybrid CDR omfattende en trunkert donor CDR sekvens hvor den manglende del til det trunkerte donor CDR er erstattet med en annen sekvens og danner et funksjonelt CDR er også beskrevet. Betegnelsen "hybrid CDR" som anvendt heri betyr et CDR omfattende et donor CDR som er blitt trunkert i en eller flere stillinger, for eksempel i den ene eller begge endene derav. Den manglende delen til det trunkerte donor CDR er erstattet med en annen sekvens for å danne et komplett eller funksjonelt CDR. Det hybride CDR har minst en aminosyreforandring sammenlignet med det komplette donor CDR. Sekvensen som erstatter den trunkerte del av CDR kan være en hvilken som helst sekvens. Ikke-donordelen av CDR sekvensen er foretrukket fra antistoffet hvorfra rammeregionen til antistoffmolekylet er avledet, slik som en germline antistoff- sekvens.

35

Man har funnet at antistoffmolekyler som omfatter et hybrid CDR bibeholder i alt vesentlig den samme bindingsaffinitet som et antistoffmolekyl som inneholder

komplette donor CDRer. Betegnelsen "i alt vesentlig den samme bindingsaffinitet" som anvendt heri betyr minst 70%, mere foretrukket minst 85% og mest foretrukket minst 95% av bindingsaffiniteten av det tilsvarende antistoffmolekyl omfattende komplette donor CDRer. Som angitt over, i bestemte tilfeller, kan affiniteten for antistoffet være større enn den til donorantistoffet. Anvendelse av et hybrid CDR gir fordeler med reduksjon av mengden av fremmed (dvs. donor) sekvens tilstede i antistoffmolekylet og kan øke antistoffmolekylets bindingsaffinitet sammenlignet med det tilsvarende antistoffmolekyl som omfatter komplette donor CDRer.

10 Hvilken som helst av CDRene i antistoffmolekylet kan være hybrid. CDR2 i den tunge kjede er foretrukket hybrid i antistoffmolekylet.

Trunkeringen av donor CDR er foretrukket fra 1 til 8 aminosyrer, mere foretrukket fra 4 til 6 aminosyrer. Det er videre foretrukket at trunkeringen gjennomføres ved C-terminalen til CDR.

Avhengig av sekvensen til den trunkerte del av CDR og sekvensen til den forskjellige sekvens som erstatter den manglende del, kan en rekke aminosyreforandringer gjøres. Foretrukket gjennomføres minst 2 aminosyreforandringer, mere foretrukket minst 3 aminosyreforandringer mest foretrukket gjennomføres minst 4 aminosyreforandringer.

Det skal særlig nevnes et antistoff hvor det andre CDR i den tunge kjede har sekvensen gitt som SEQ ID NO:2. Dette har bedre affinitet for dets antigen enn donorantistoffet hvorfra en del av CDR er avledet.

En nukleinsyresekvens som koder for antistoffmolekylet som omfatter et hybrid CDR er også beskrevet.

30 En ekspresjonsvektor som inneholder nukleinsyresekvensen som koder for antistoffmolekylet som omfatter et hybrid CDR er også beskrevet.

En vertscelle som er transformert med vektoren er også beskrevet.

35 En fremgangsmåte for fremstilling av et antistoffmolekyl som omfatter et hybrid CDR som omfatter dyrking av vertscellen og isolering av antistoffmolekylet er også beskrevet.

Videre er de etterfølgende eksempler angitt som refererer til de vedlagte tegninger, hvor:

- Figur 1 viser rammeregionene til human lett kjede subgruppe 1 sammenlignet med
5 rammeregionene til hTNF40 lett kjede (SEQ ID NO:83 til 90),
figur 2 viser rammeregionene til human tung kjede subgruppe 1 og subgruppe 3
sammenlignet med rammeregionene til hTNF40 tung kjede (SEQ ID NO:91 til 98
og 106 til 109), figur 3 viser aminosyresekvensen til CDRene av hTNF40 (SEQ ID
NO:1 til 7), hvor CDR H2' er et hybrid CDR hvor de C-terminale seks aminosyrer er
10 fra H2 CDR-sekvensen til et humant subgruppe 3 germline antistoff og hvor
aminosyreforandringene på sekvensen resulterende fra denne hybridisering er
understreket,
figur 4 viser vektor pMR15.1,
figur 5 viser vektor pMR14,
15 figur 6 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av det
murine hTNF40VI (SEQ ID NO:99),
figur 7 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av det
murine hTNF40Vh (SEQ ID NO:100),
figur 8 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av hTNF40-
20 gL1 (SEQ ID NO:8),
figur 9 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av hTNF40-
gL2 (SEQ ID NO:9),
figur 10 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av
gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10),
25 figur 11 viser nukleotidsekvensen og den predikterte aminosyresekvens av
gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11),
figur 12 viser vektor CTIL5-gL6,
figur 13 viser strukturen til en forbindelse betegnet CDP870 omfattende et
modifisert Fab-fragment avledet fra antistoff hTNF40 kovalent koblet via en
30 cysteinrest til en lysyl-maleimid linker hvor hver aminogruppe på lysylresten har
kovalent bundet dertil en metoksy PEG-rest hvor n er omtrent 420,
figur 14 viser vektor pTTQ9,
figur 15 viser sekvensen av OmpA oligonukleotidadapteren (SEQ ID NO:101),
figur 16 viser vektor pACYC184,
35 figur 17 viser vektor pTTO-1,
figur 18 viser vektor pTTO-2,
figur 19 viser vektor pDNAbEng-G1,

- figur 20 viser oligonukleotidkassetene som koder for forskjellige intergeniske sekvenser for *E. coli* modifisert Fab ekspresjon (SEQ ID NO:102 til 105), figur 21 viser periplasmisk modifisert Fab akkumulering av IGS-varianter, figur 22 viser vektor pTTO(CDP870),
- 5 figur 23 viser sykdomsaktivitetsscoren (DAS) i pasienter behandlet med ulike doser av CDP870 og placebo. Median og IQ-områder er angitt for per-protokollpopulasjon med siste observasjon overført. Små firkanter indikerer placebo, romber indikerer 1 mg/kg, trekkanter indikerer 5 mg/kg og store firkanter indikerer 20 mg/kg,
- 10 figur 24 viser antallet ømme ledd, antallet hovne ledd, smerte-score, fagmannens globale vurdering av sykdomsaktivitet, modifisert "health assessment questionnaire" (HAQ), C reaktivt protein (CRP) og erytrocytt- sedimenteringsrate (ESR) i pasienter behandlet med forskjellige doser av CDP870 og placebo. Median og IQ område er angitt for pre-protokollpopulasjonen med siste
- 15 observasjon overført. Små firkanter indikerer placebo, romber indikerer 1 mg/kg, trekkanter indikerer 5 mg/kg og store firkanter indikerer 20 mg/kg.

EKSEMPLER

20 Genkloning og ekspresjon av et kimært hTNF40 antistoffmolekyl

RNA fremstilling fra hTNF40 hybridomceller

- Total RNA ble fremstilt fra 3×10^7 hTNF40 hybridomceller som beskrevet under.
- 25 Cellene ble vasket i fysiologisk saltoppløsning og oppløst i RNAzol (0,2 ml per 10^6 celler). Kloroform (0,2 ml per 2 ml homogenat) ble tilsatt, blandingen ble rystet kraftig i 15 sekunder og deretter etterlatt på is i 15 minutter. De oppnådde vandige og organiske faser ble separert ved sentrifugering i 15 minutter i en Eppendorf sentrifuge og RNA ble presipitert fra den vandige fase ved tilsetning av et likt
- 30 volum isopropanol. Etter 15 minutter på is ble RNA pelletisert ved sentrifugering, vasket med 70% etanol, tørket og oppløst i sterilt, RNAse fritt vann. Utbyttet av RNA var 400 µg.

PCR-kloning av hTNF40 Vh og VI

35

cDNA sekvenser som koder for de variable domener av hTNF40 tung og lett kjede ble syntetisert ved anvendelse av revers transkriptase for å produsere enkelttrådede cDNA kopier av mRNA tilstede i det totale RNA, etterfulgt av

Polymerase Chain Reaction (PCR) på cDNAene med spesifikke oligonukleotid primere.

a) cDNA syntese

5

cDNA ble syntetisert i et 20 µl reaksjonsvolum inneholdende de etterfølgende reagenser: 50mM Tris-HCl pH, 8,3, 75 mM KCl, 10 mM ditiotritol, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM av hvert deoksyribonukleosidtrifosfat, 20 enheter RNAsin, 75 ng random heksanukleotidprimer, 2 µg hTNF40 RNA og 200 enheter Moloney Murine

10 Leukemia Virus revers transkriptase. Etter inkubasjon ved 42°C i 60 minutter ble reaksjonen terminert ved oppvarming ved 95°C i 5 minutter.

b) PCR

Alikvoter av cDNA ble underkastet for PCR ved anvendelse av kombinasjonen av
15 primere som er spesifikke for de tunge og lette kjeder. Nukleotidsekvensene til 5' primerne for de tunge og lette kjeder er henholdsvis vist i tabeller 1 og 2. Disse sekvenser inneholder alle, i rekkefølge, et restriksjonssete som starter 7 nukleotider fra deres 5' ender, sekvensen GCCGCCACC (SEQ ID NO:12), for å tillate optimal translasjon av de resulterende mRNAer, et initeringskoden og 20-30
20 nukleotider basert på lederpeptidsekvensene til kjente museantistoffer (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

25 3' primerne er vist i tabell 3. Lett kjede primeren spenner over J-C-forbindelsen til antistoffet og inneholder et restriksjonssete for enzymet Sp1I for å forenkle kloning av V1 PCR fragmentet. Tung kjede 3' primerne er en blanding som er utformet til å spenne over J-C forbindelsen til antistoffet. 3' primeren inkluderer et Apal restriksjonssete for å forenkle kloning. 3' regionen av primerne inneholder en
30 blandet sekvens basert på dem funnet i kjente museantistoffer (Kabat *et al.*, 1991, *supra*).

Kombinasjonene av primere beskrevet over muliggjør at PCR-produktene for Vh og VI kan klones direkte inn i en passende ekspresjonsvektor (se under) for å
35 danne kimære (mus-human) tunge og lette kjeder og at disse gener kan uttrykkes i pattedyrceller for å danne kimære antistoffer av ønsket isotype.

Inkubasjoner (100 µl) for PCR ble satt opp som følger. Hver reaksjon inneholdt 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 0,25 mM av hvert deoksyribonukleosidtrifosfat, 10 pmol 5' primer blanding (tabell 4), 10 pmol 3' primer (CL12 (lett kjede) eller R2155 (tung kjede) (tabell 3)), 1 µl cDNA og 1 enhet Taq polymerase. Reaksjoner ble inkubert ved 95°C i 5 minutter og deretter syklisert gjennom 94°C i 1 minutt, 55°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Etter 30 sykluser ble aliquoter fra hver reaksjon analysert ved elektroforese på en agarosegel. Lett kjede reaksjoner som inneholdt 5' primerblandinger fra lett kjede pooler 1, 2 og 7 ga bånd med størrelser som var konsistente med full lengde VI fragmenter, mens reaksjonen fra tung kjede reaksjonspool 3 ga et fragment med en størrelse forventet av et Vh gen. Båndet dannet ved lett kjede pool 1 primerne ble ikke fulgt opp da tidligere resultater hadde vist at dette bånd svarer til et lett kjede pseudogen produsert ved hjelp av hybridomceller. Båndet produsert ved lett kjede pool 7 primerne var svakere enn båndet fra pool 2 primerne og ble derfor ikke fulgt opp. Kun båndet fra lett kjede reaksjonspool 2, som var det sterkeste båndet, ble fulgt opp.

c) Molekylær kloning av PCR-fragmentene

DNA-fragmentene dannet i lett kjede reaksjonspoolen 2 ble kuttet med enzymene BstBI og Sp1I, konsentrert ved etanol presipitering, underkastet elektroforese på en 1,4% agarosegel og DNA-bånd i området 400 basepar ble utvunnet. Disse ble klonet ved ligering inn i vektoren pMR15.1 (figur 4) som var blitt underkastet restriksjon med BstBI og Sp1I. Etter ligering ble blandinger transformert in i *E. coli* LM 1035 og plasmider fra de resulterende bakteriekolonier ble screenet for insersjoner ved kutting med BstBI og Sp1I. Representativer med insersjoner fra hver ligering ble analysert videre ved nukleotidsekvensering.

På tilsvarende måte ble DNA-fragmentene dannet i tung kjede reaksjonspool 3 kuttet med HindIII og ApaI og klonet inn i vektoren pMR14 (figur 5) som var blitt underkastet restriksjon med HindIII og ApaI. Igjen ble representative plasmider som inneholdt insersjoner analysert ved nukleotidsekvensering.

d) Nukleotid sekvensanalyse

Plasmid DNA fra en rekke isolater inneholdende Vh-insersjoner ble sekvensert ved anvendelse av primerne R1053 (se tabell 5) (som primer i 3' regionen av HCMV-promoteren i pMR14) og R720 (se tabell 5) (som primer i 5' region av human C-gamma 4 og tillater sekvensering gjennom DNA insersjonen på pMR14). Det ble

funnet at nukleotidsekvensene til Vh insersjonen i en rekke kloner var identiske, unntatt for forskjeller i signalpeptidet og J-regionen. Dette indikerte at klonene som undersøkes er uavhengige isolater som stammer fra anvendelsen av forskjellige primere fra blandingen av oligonukleotider under PCR-stadiet. Den bestemte nukleotidsekvens og predikerte aminosyresekvens av det variable domenet av den tunge kjede til antistoff hTNF40 (hTNF40Vh) er gitt i figur 7 (SEQ ID NO:100).

For å analysere lett kjede klonene, ble sekvensen avledet fra priming med R1053 (se tabell 5) og R684 (SEQ ID NO:62) (som primer i 5' regionen av human C-kappa og tillater sekvensering gjennom DNA-insersjonen på pMR15.1) undersøkt. Nukleotidsekvensen og den predikerte aminosyresekvens til VI-genene som skyldes reaksjoner i pool 2 ble tilsvarende analysert. Igjen ble det funnet at nukleotidsekvensene til VI-insersjonen i en rekke kloner var identiske, unntatt for forskjeller i signalpeptidet og J-regionene, som indikerer at de undersøkte kloner var uavhengige isolater som kommer av anvendelsen av ulike primere fra blandingen av oligonukleotider anvendt under PCR-stadiet. Den bestemte nukleotidsekvens og predikerte aminosyresekvens til det variable domenet av lett kjeden av antistoff hTNF40 (hTNF40VI) er gitt i figur 6 (SEQ ID NO:99).

20

TABELL 1

Oligonukleotidprimere for 5' regionen av tunge kjeder fra mus.

- CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEQ ID NO:13)
 CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEQ ID NO:14)
 CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (SEQ ID NO:15)
 CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEQ ID NO:16)
 CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEQ ID NO:17)
 CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEQ ID NO:18)
 CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEQ ID NO:19)
 CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEQ ID NO:20)
 CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEQ ID NO:21)
 CH10 : 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCT3'(SEQ ID NO:22)
 CH11 : 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEQ ID NO:23)
 CH12 : 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

25

Hver av de ovennevnte primere har sekvensen
5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:25) addert til sin 5'-ende.

TABELL 2

5

Oligonukleotidprimere for 5' regionen av lette kjeder fra mus.

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

10

- CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTCAAT3' (SEQ ID NO:34)
 CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)
 CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTTCTATTTC3' (SEQ ID NO:36)
 CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3' (SEQ ID NO:37)
 CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEQ ID NO:38)
 CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)
 CL13 : 5'ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)
 CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)
 CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)
 CL16 : 5'ATGGATTTCAATTGGTCCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)
 CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)
 CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)
 CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

Hver av de ovennevnte primere har sekvensen
5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:47) addert til sin 5'-ende.

TABELL 3

5

Oligonukleotidprimere for 3'-endene av Vh og VI musegener.

Lett kjede (CL12):

10 **5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEQ ID NO:48)**

Tung kjede (R2155):

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

15 TABELL 4

a) 5' primerblandinger for lett kjede PCR-reaksjoner

pool 1 : CL2.

pool 2 : CL7.

pool 3 : CL13.

pool 4 : CL6.

pool 5 : CL5A, CL9, CL17A.

pool 6 : CL8.

pool 7 : CL12A.

pool 8 : CL1, CL3, CL4, CL5, CL10, CL11, CL2B, CL14, CL15, CL16, CL17B, CL17C

20 b) 5' primerblandinger for tung kjede PCR-reaksjoner

pool 1 : CH1, CH2, CH3, CH4.

pool 2 : CH5, CH6, CH7, CH8.

pool 3 : CH9, CH10, CH11, CH12.

TABELL 5

25 Primer anvendt i nukleotidsekvensanalyse

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

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

Evaluering av aktiviteter til kimære gener.

5

Aktiviteterne til de kimære gener ble evaluert ved å uttrykke dem i pattedyrceller å rense og kvantifisere de nylige syntetiserte antistoffer. Metodologien for dette er beskrevet under, etterfulgt av en beskrivelse av de biokjemiske og cellebaserte analyser anvendt for den biologiske karakterisering av antistoffene.

10

a) Fremstilling av kimært hTNF40 antistoffmolekyl

Kimært antistoff for biologiske evaluering ble fremstilt ved transient ekspresjon av de passende tung og lett kjede parene etter ko-transfeksjon inn i Chinese Hamster

15 Ovary (CHO) celler ved anvendelse av kalsiumfosfatpresipitering.

På dagen før transfeksjon, ble semi-konfluente kolber av CHO-L761-celler trypsinbehandlet, cellene ble talt og T75-kolber ble satt opp som hver hadde 10⁷-celle.

20 Neste dag ble dyrkingsmediet forandret 3 timer før transfeksjon. For transfeksjon ble kalsiumfosfatpresipitatet fremstilt ved å blande 1,25 ml 0,25M CaCl₂

inneholdende 50 µg av hver av tung og lett kjede ekspresjonsvektorer med 1,25 ml 2 x HBS (16,36 g NaCl, 11,0 g HEPES og 0,4 g Na₂HPO₄ i 1 liter vann med pH innstilt til 7,1 med NaOH) og umiddelbar tilsetning til mediet av cellene. Etter 3

25 timer ved 37°C i CO₂ inkubator ble medium og presipitat fjernet og cellene ble sjokkbehandlet ved tilsetning av 15 ml 15% glycerol i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) i 1 minutt. Glycerol ble fjernet, cellene ble vasket en gang med PBS og inkubert i 48-96 timer i 25 ml medium inneholdende 10 mM natriumbutyrat.

Antistoff kunne renses fra dyrkingsmediet ved binding til og eluering fra protein A-

30 Sepharose.

b) ELISA

For ELISA, ble Nunc ELISA-plater belagt over nattet ved 4°C med et F(ab)₂-

35 fragment av et polyklonalt geit anti-humant Fc fragment spesifikt antistoff (Jackson Immunoresearch, code 109-006-098) ved 5 µg/ml i belegningsbuffer (15 mM natriumkarbonat, 35 mM natriumhydrogenkarbonat, pH 6,9). Ikke-belagt antistoff

ble fjernet ved vasking 5 ganger med destillert vann. Prøver og rensede standarder som skulle kvantifiseres ble fortynnet til omtrent 1 µg/ml i konjugert buffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,1M NaCl, 0,2% volum/volum Tween 20, 0,2% vekt/volum Hammersten casein). Prøvene ble titrert i mikrotiterbrønnene i 2-
 5 ganger fortynninger til å gi et sluttvolum på 0,1 ml i hver brønn og platene ble inkubert ved romtemperatur i 1 time med rysting. Etter det første inkubasjonstrinn ble platene vasket 10 ganger med destillert vann og deretter inkubert i 1 time som før med 0,1 ml av et mus monoklonalt anti-humant kappa (klon GD12) peroksidase-konjugert antistoff (The Binding Site, code MP135) ved en fortynning
 10 på 1 i 700 i konjugert buffer. Platen ble igjen vasket og substratopløsning (0,1 ml) ble tilsatt til hver brønn. Substratopløsningen inneholdt 150 µl N,N,N,N-tetrametylbenzidin (10 mg/ml i DMSO), 150 µl hydrogenperoksyd (30% oppløsning) i 10 ml 0,1 M natriumacetat/natriumcitrat, pH 6,0. Platen ble utviklet i 5-10 minuttet inntil absorbansen ved 630 nm var omtrent 1,0 for topp-standardene.
 15 Absorbans ved 630 nm ble målt ved anvendelse av en plateavleser og konsentrasjonen til prøven ble bestemt ved å sammenligne titreringskurvene med standardkurvene.

c) Bestemmelse av affinitetskonstanter ved BiaCore analyse.

20

Bindingsinteraksjonen mellom hTNF40 og human TNF ble undersøkt ved anvendelse av BIA-teknologi. Et affinitetsrenset geit polyklonalt antistoff, rettet mot den konstante region av hTNF40, ble immobilisert på dekstranpolymer-sensorchip-overflaten ved anvendelse av standard NHS/EDC-kjemi. Relativt lave nivåer (200-
 25 500 RU) av hTNF40 var fastholdt for å sikre at massetransporteffektene var minimalisert. Humant TNF ved forskjellige konsentrasjoner ble ført over det fastholdte hTNF40 for fastsettelse av assosiasjonskinetikene. Etter injeksjonen av ligand, ble buffer ført over flaten slik at dissosiasjonen kunne måles. Assosiasjons- og dissosiasjons-hastighetskonstantene for interaksjonen mellom
 30 fast fase hTNF40 og human TNF ble beregnet, og en K_D verdi ble utledet.

EKSEMPEL 1

CDR-poding av hTNF40

35

Molekylær kloning av gener for de variable regioner av de tunge og lette kjeder av hTNF40 antistoffet og deres anvendelse for å produsere kimære (mus-human) hTNF40 antistoffer er blitt beskrevet over. Nukleotid- og aminosyresekvensene til

de murine hTNF40 VI og Vh er vist i henholdsvis figurer 6 og 7 (SEQ ID NO:99 og 100). Dette eksempel beskriver CDR-podingen av hTNF40 antistoffet.

CDR-poding av hTNF40 lett kjede

5

Oppstilling av rammeregionene av hTNF40 lett kjede med dem til de fire humane lett kjede subgrupper (Kabat *et al.*, 1991, *supra*) viste at hTNF40 var mest homolog med antistoffer i human lett kjede subgruppe 1. Følgelig, for konstruksjon av CDR-podet lett kjede, korresponderte de valgte rammeregioner med dem til den humane gruppe 1 konsensus-sekvens.

En sammenligning av aminosyresekvensene til rammeregionen av murin hTNF40 og konsensus human gruppe 1 lett kjedene er gitt i figur 1 og viser at det er 22 forskjeller (understreket) mellom de to sekvenser. Analyse av bidraget som hvilken som helst av disse rammeforskjeller kan ha på antigenbinding identifiserer 2 rester for undersøkelse, disse er i stillinger 46 og 60. Basert på denne analyse, ble to versjoner av CDR-podet lett kjede konstruert. I den første av disse, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8), er rester 46 og 60 avledet fra hTNF40 lett kjeden mens i den andre, hTNF40-gL2 (SEQ ID NO:9), er alle rester human konsensus unntatt rest nummer 60 som er fra hTNF40 lett kjeden.

Konstruksjon av CDR-podet lett kjede hTNF40-gL1.

Konstruksjonen av hTNF40-gL1 er gitt nedenfor i detalj. De etterfølgende overlappende oligonukleotider (P7982-P7986) ble anvendt i polymerase-kjede-reaksjonene (PCR) for å sammenstille en trunkert podet lett kjede. Det sammenstilte fragment mangler antistoff-ledersekvensen og de første 17 aminosyrer av ramme 1.

30

oligo 1 P7982:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTA~~CTA~~AC
GTAGCCTGGTATCAGCAA~~A~~3' (SEQ ID NO:52)

oligo 2 P7983:

5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGC~~TTTTGGGGCTTTACCTGGTTT~~
TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEQ ID NO:53)

oligo 3 P7984:

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

oligo 4 P7985

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

oligo 5 P7986:

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

Fwd P7981:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (SEQ ID NO:57)

Bwd P7980

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

En PCR-reaksjon, 100 µl ble oppstilt inneholdende, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 0,25 mM av hvert deoksyribonukleosidtrifosfat, 2 pmol av P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10
5 pmol av P7980, P7981 og 1 enhet av Taq polymerase. Reaksjoner ble sykliserte gjennom 94°C i 1 minutt, 55°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Etter 30 sykluser ble hver reaksjon analysert ved elektroforese på en agaros gel og PCR-fragmentet ble skåret ut fra gelen og utvunnet ved anvendelse av et Mermaid Kit. Det oppnådde fragment ble underkastet restriksjon med enzymene BstEII og SphI i den passende
10 buffer. Det oppnådde produkt ble til slutt underkastet elektroforese på en agarose-gel og 270 basepar DNA fragmentet ble utvunnet fra en gelskive og ligert inn i vektor CTIL5-gL6 (figur 12), som på forhånd var blitt kuttet med de samme enzymer. Den ovennevnte vektor tilveiebringer den manglende antistoff-
ledersekvens og de første 17 aminosyrer av ramme 1.

15

Ligeringsblandingen ble anvendt for å transformere *E. coli* stamme LM1035 og de resulterende kolonier ble analysert ved PCRer, restriksjonsenzym-kuttinger og nukleotid sekvensering. Nukleotid- og aminosyresekvensen for VI regionen av hTNF40-gL1 er vist i figur 8 (SEQ ID NO:8).

Konstruksjon av CDR-podet lett kjede hTNF40-gL2

hTNF40-gL2 (SEQ ID NO:9) ble konstruert ved anvendelse av PCR. De 5 etterfølgende oligonukleotider ble anvendt for å introdusere aminosyreforandringene:

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

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

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

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

10 To reaksjoner, hver på 20 µl, ble satt opp som hver inneholdt 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 0,25 mM av hvert deoksyribonukleosidtrifosfat, 0,1 µg hTNF40-gL1, 6 pmol R1053/R5350 eller
15 reaksjon analysert ved elektroforese på en agarosegel og PCR fragmentene ble skåret ut fra gelen og utvunnet ved anvendelse av et Mermaid Kit.

Alikvoter av disse ble deretter underkastet for en andre runde av PCRer.
Reaksjonen, 100 µl, inneholdt 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM
20 KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 1/5 av hver av PCR fragmentene fra den første gruppe av reaksjoner, 30 pmol R1053 og R684 og 2,5 enheter Taq polymerase. Reaksjonstemperaturene var som over. Etter PCR ble blandingen ekstrahert med fenol/kloroform og deretter med kloroform og presipitert med etanol.
Etanolpresipitatet ble utvunnet ved sentrifugering, oppløst i den passende buffer
25 og underkastet restriksjon med enzymene BstEII og SphI. Det oppnådde produkt ble til slutt underkastet elektroforese på en agarosegel og 270 basepar DNA fragmentet ble utvunnet fra en gelskive og ligert inn i vektoren pMR15.1 (figur 4) som på forhånd var blitt kuttet med de samme enzymene.

Ligeringsblandingen ble anvendt til å transformere *E. coli* LM1035 og de oppnådde kolonier ble analysert ved PCR, restriksjonsenzymkuttinger og nukleotidsekvensering. Nukleotid- og aminosyresekvensen for VI region av hTNF40-gIL2 er vist i figur 9 (SEQ ID NO:9).

5

CDR-poding av hTNF40 tung kjede

CDR-poding av hTNF40 tung kjede ble gjennomført ved anvendelse av den samme strategi som beskrevet for den lette kjede. hTNF40 tung kjede ble funnet til å være mest homolog med humane tunge kjeder som tilhører subgruppe 1 og konsensus-sekvensen av de humane subgruppe 1 rammeverk ble derfor valgt til å akseptere hTNF40 tung kjede CDRene.

For å undersøke kravet hos en homolog human ramme til å virke som en akseptorramme for CDR poding, ble en andre ramme, human gruppe 3, valgt for å humanisere hTNF40 tung kjede.

En sammenligning av hTNF40 med de to forskjellige rammeregioner er vist i figur 2 hvor det fremgår at hTNF40 avviker fra den humane subgruppe 1 konsensus i 32 posisjoner (understreket) og avviker fra den humane subgruppe 3 konsensus i 40 posisjoner (understreket). Etter analyse av bidraget som hvilken eller hvilke av disse kan gi til antigenbinding, ble rester 28, 38, 46, 67, 69 og 71 bibeholdt som donor i CDR-podet tung kjede gh1hTNF40.1, ved anvendelse av gruppe 1 rammen. Rester 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 og 78 ble bibeholdt som donor i CDR-podet tung kjede gh3hTNF40.4 ved anvendelse av gruppe 3 rammen. Rester 28, 69 og 71 ble bibeholdt som donor i CDR-podet tung kjede gh1hTNF40.4 ved anvendelse av gruppe 1 rammen.

30

Konstruksjon av CDR-podet tung kjede gh1hTNF40.4

gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10) ble samlet ved underkaste overlappende oligonukleotider for PCR i nærvær av de passende primere. De etterfølgende oligonukleotider ble anvendt i PCR:

35 Gruppe 1 poding

oligo 1 P7989:

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

oligo 2 P7990:

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

oligo 3 P7991:

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

oligo 4 P7995:

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

oligo 5 P7992:

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

oligo 6 P7993:

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

oligo 7 P7994:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCCTC3' (SEQ ID NO:69)

Fwd: P7988:

5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTTC3' (SEQ ID NO:70)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

Sammenstillingsreaksjonen, 100 µl, inneholdt 10 mM Tris-Hcl pH 8,3, 1,5 mM
5 MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 0,25 mM av hvert deoksyribo-
nukleosidtrifosfat, 2 pmol av hver av p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993

og p7994, 10 pmol av hver av p7988 og p7987 og 1 enhet Taq polymerase. Reaksjoner ble syklisert gjennom 94°C i 1 minutt, 55°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Etter 30 sykluser ble reaksjonen ekstrahert med fenol/kloroform (1/1), deretter med kloroform og presipitert med etanol. Etter sentrifugering ble DNA
5 oppløst i den passende restriksjonsbuffer og kuttet med ApaLI og KpnI. Det oppnådde fragment ble isolert fra en agarose gel og ligert inn i pMR14 (figur 5) som på forhånd var blitt kuttet med de samme enzymer. pMR14 inneholder human gamma 4 tung kjede konstant regionen når pMR14 er kuttet med ApaLI og KpnI, idet den kuttete vektor er i stand til å motta det kuttete DNA slik at 3' enden
10 av det kuttete DNA forenes i leserammen til 5' enden av sekvensen som koder for gamma 4 konstant regionen. Den tunge kjede som uttrykkes fra denne vektor vil derfor være en gamma 4 isotype. Ligeringsblandingen ble anvendt til å transformere *E. coli* LM1035 og resulterende bakteriekolonier ble screenet ved restriksjonskutting og nukleotidsekvensanalyse. På denne måte ble et plasmid
15 identifisert som inneholdt den korrekte sekvens for gh1hTNF40.4 (figur 10) (SEQ ID NO:10).

Konstruksjon av CDR-podet tung kjede gh3hTNF40.4

20 gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11) ble sammenstilt ved å underkaste overlappende oligonukleotider for PCR i nærvær av de passende primere. De etterfølgende oligonukleotider ble anvendt i PCR:

Gruppe 3 poding

oligo 1 P7999:

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

oligo 2 P8000:

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

oligo 3 P8001

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

oligo 4 P7995:

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

oligo 5 P7997:

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

oligo 6 P7998:

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

oligo 7 P7993:

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

Fwd P7996:

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:78)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

Sammenstillingsreaksjonen, 100 µl, inneholdt 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM
5 MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01% vekt/volum gelatin, 0,25 mM av hvert

deoksyribonukleosidtrifosfat, 2 pmol av hver av p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 og p7993, 10 pmol av hver av p7996 og p7987 og 1 enhet Taq polymerase. Reaksjoner ble syklisert gjennom 94°C i 1 minutt, 55°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Etter 30 cykluser ble reaksjonen ekstrahert med fenyl/kloroform (1/1) og deretter med kloroform og presipitert med etanol. Etter sentrifugering ble DNA oppløst i den passende restriksjonsbuffer og kuttet med ApaLI og KpnI. Det oppnådde fragment ble isolert fra en agarosegel og ligert inn i pMR14 (figur 5) som på forhånd var blitt kuttet med de samme enzymer. pMR14 inneholdt human gamma 4 tung kjede konstant regionen. Når pMR14 kuttes med ApaLI og KpnI, er den kuttete vektor i stand til å motta det kuttete DNA slik at 3' enden av det kuttete DNA forenes i leserammen til 5' enden av sekvensen som koder for gamma 4 konstant regionen. Derfor vil den tunge kjede som uttrykkes fra denne vektor være en gamma 4 isotype. Ligeringsblandingen ble anvendt til å transformere *E. coli* LM1035 og resulterende bakteriekolonier ble screenet ved restriksjonskutting og nukleotidsekvensanalyse. På denne måte ble et plasmid identifisert som inneholdt den korrekte sekvens for gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11) (figur 11).

Fremstilling av CDR-podet modifisert Fab fragment

20

Et CDR-podet, modifisert Fab fragment, basert på antistoff hTNF40, ble konstruert ved anvendelse av *E. coli* vektoren pTTO-1. De variable regioner av antistoff hTNF40 sub-kloner inn i denne vektor og den intergeniske sekvensen optimaliseres for å danne pTTO(CDP870). pTTO ekspresjonsvektoren designes for å føre til oppløselig, periplasmisk akkumulering av rekombinante proteiner i *E. coli*. Hovedtrekkene til dette plasmid er:

- (i) tetracyklin-resistensmarkør - antibiotika ikke inaktivert ved produktet av resistens-gen, følgelig er seleksjon for plasmidholdige celler opprettholdt,
- (ii) lavt kopitall - replikasjons-origo avledet fra plasmid p15A, som er kompatibelt med plasmider inneholdende colE1 avlede replikoner,
- (iii) sterk, induserbar tac promoter for transkripsjon av et eller flere klonede gener,
- (iv) $lacI^q$ gen - gir konstitutiv ekspresjon av lac-repressorproteinet, opprettholder tac promotoren i den undertrykte tilstand inntil induksjon med IPTG/allolaktose,
- (v) OmpA signalsekvens - gir periplasmisk sekresjon av et eller flere klonede gener, og
- (vi) translasjonskobling av OmpA signalsekvens til et kort lacZ peptid, gir effektiv initiering av translasjon.

Vektoren er blitt utviklet for ekspresjon av modifiserte Fab fragmenter fra en dicistronisk message ved design av en metode for å selektere empirisk den optimale intergeniske sekvens fra en serie av fire formålsbestemte kassetter. Anvendelsen av denne i konstruksjonen av pTTO(CDP870) er beskrevet.

5

Materialer og metoder

DNA teknikker

10 Standardteknikker ble anvendt for protokoller som inkluderer DNA restriksjon, agarosegelelektroforese, ligering og transformasjon. Restriksjonsenzymmer og DNA modifiserende enzymer ble oppnådd fra New England Biolabs eller Boehringer Mannheim, og ble anvendt i henhold til produsentens anbefalinger. DNA fragmenter ble rensed fra agarose ved anvendelse av GeneClean protokollen (BIO
15 101). Oligonukleotider ble supplert ved Oswel Oligonucleotide Service og ble syntetisert i 40 nm målestokken. Plasmid DNA ble isolert ved anvendelse av Plasmid DNA Mini/Midi kit fra Qiagen. PCR ble gjennomført ved anvendelse av Perkin Elmer "Amplitaq" som anbefalt. DNA sekvenseringen ble utført ved anvendelse av "the Applied Biosystems Taq cycle sequencing kit".

20

Rystekolbe induksjon

E. coli W3110 kulturer ble dyrket i L-medium supplert med tetracyklin (7,5 µg/ml). For induksjoner ble nye kulturer som var dyrket over natten (dyrket ved 30°C)
25 fortynnet til en OD₆₀₀ på 0,1 i 200 ml L-medium i en 2 L plate-kolbe og ble dyrket ved 30°C i en orbital inkubator. Ved en OD₆₀₀ på 0,5, ble IPTG tilsatt til 200 µM. Prøver (normalisert for OD) ble tatt ved intervaller.

Periplasmisk ekstraksjon

30

Dyrkingsprøver ble avkjølt på is (5 minutter) og deretter ble celler høstet ved sentrifugering. Etter resuspensjon i ekstraksjonsbuffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) ble prøver inkubert over natten ved 30°C, deretter klaret ved sentrifugering.

35

Sammenstillingsanalyse

Modifiserte Fab konsentrasjoner ble bestemt ved ELISA. Plater ble belagt ved 4°C over natten med anti-human Fd 6045 (2 µg/ml i belegningsbuffer, fysiologisk saltoppløsning, 100 µl per brønn). Etter vasking ble 100 µl prøve applisert per brønn, idet rensed A5B7 gamma-1 Fab', opprinnelig ved 2 µg/ml, ble anvendt som en standard. Prøver ble seriefortynnet 2-ganger over platen i prøvekonjugatbuffer (per liter: 6,0 g trisaminometan, 2,92 g NaCl, 0,1 ml Tween-20, 1 ml kasein (0,2%)), og plater ble inkubert i 1 time ved romtemperatur med rysting. Platene ble vasket og tørket, deretter ble 100 µl anti-human C-kappa (GD12) peroksidase tilsatt (fortynnet i prøvekonjugatbuffer). Inkubasjon ble gjennomført ved romtemperatur i 1 time med rysting. Platene ble vasket og tørket, deretter ble 100 µl substratoppløsning tilsatt (10 ml natriumacetat/citratoppløsning (0,1M pH 6), 100 µl H₂O₂ oppløsning, 100 µl tetrametylbenzidinoppløsning (10 mg/ml i dimetylsulfoksyd). Absorbans ved 630 nm ble avlest 4-6 minutter etter substrattilsetning.

15

Konstruksjon av plasmid pTTO-1

(a) Erstatning av pTTQ9 polylinker

Plasmid pTTQ9 ble oppnådd fra Amersham og er vist i figur 14. En alikvot (2 µg) ble kuttet med restriksjonsenzymmer Sall og EcoRI, kuttingen ble kjørt på en 1% agarosegel og det store DNA fragment (4520 bp) ble rensed. To oligonukleotider ble syntetisert som, når annealet tilsammen, koder for OmpA polylinker-regionen vist i figur 15. Denne sekvens har kohesive ender som er kompatible med Sall og EcoRI endene dannet ved restriksjon av pTTQ9. Ved kloning av denne oligonukleotid "kassett" inn i pTTQ9 vektoren, regenereres ikke Sall setet, men EcoRI setet opprettholdes. Kassetten koder for de første 13 aminosyrer av signalsekvensen av *E. coli* ytter-membranproteinet Omp-A, som kommer etter Shine Dalgarno ribosom bindingssetet av OmpA genet. I tillegg er restriksjonsseter for enzymer XbaI, MunI, StyI og SplI tilstede. MunI og StyI setene er innen koderegion av OmpA signalsekvensen og er tenkt som 5' kloningssetene for insersjon av gener. De to oligonukleotider som utgjør denne kassett ble annealet sammen ved blanding med en konsentrasjon på 5 pmol/µl og oppvarming i et vannbad til 95°C i 3 minutter, deretter sakte avkjøling til romtemperatur. Den annealede sekvens ble deretter ligert inn i Sall/EcoRI kuttingen pTTQ9. Det oppnådde plasmid-mellomprodukt, betegnet pTQOmp, ble verifisert ved DNA sekvensering.

(b) Fragmentfremstilling og ligering

Plasmid pTTO-1 ble konstruert ved ligering av et DNA fragment fra plasmid pACYC184 til to fragmenter dannet fra pTQOmp. Plasmid pACYC184 ble
 5 oppnådd fra New England Biolabs, og et restriksjonskart er vist i figur 16. En
 alikvot (2 µg) ble kuttet fullstendig med restriksjonsenzym StyI, deretter behandlet
 med Mung Bean Nuclease, denne behandling danner butte ender ved kutting av 5'
 base overheng. Etter fenolekstraksjon og etanolpresipitering, ble DNA underkastet
 restriksjon med enzym PvuII, med dannelse av fragmenter på 2348, 1081, 412 og
 10 403 bp. 2348 bp fragmentet ble rensset etter agarosegelelektroforese. Dette
 fragment koder for tetracyklinresistensmarkøren og p15A replikasjons-origo.
 Fragmentet ble deretter behandlet med alkalisk fosfatase fra kalvetarm for å fjerne
 5' terminale fosfater, for derved å forhindre selv-ligeringen av dette molekyl.

15 En alikvot (2 µg) av plasmid pTQOmp ble kuttet med enzymer SspI og EcoRI, og
 2350 bp fragmentet ble rensset fra uønskede fragmenter på 2040 bp og 170 bp
 etter agarosegelelektroforese, idet dette fragment koder for transkripsjons-
 terminator-regionen og lacI^q genet. En annen alikvot (2 µg) av pTQOmp ble kuttet
 med EcoRI og XmnI, med dannelse av fragmenter på 2289, 1670, 350 og 250 bp.
 20 350 bp fragmentet, som koder for tac promoteren, OmpA signalsekvens og multi-
 kloningssete, ble gelrenset.

De tre fragmenter ble deretter ligert ved anvendelse av passende ekvimolare
 mengder av hvert fragment, for å danne plasmidet pTTO-1. Alle
 25 kloningsforeninger ble verifisert ved DNA sekvensering. Restriksjonskartet for
 dette plasmid er vist i figur 17. Plasmid pTTO-2 ble deretter dannet ved insersjon
 av DNA som koder for human Ig lett kjede kappa konstant domenet. Dette ble
 oppnådd som et SphI - EcoRI restriksjonsfragment fra plasmid pHC132, og
 insertert inn i de tilsvarende seter i pTTO-1. Plasmid pTTO-2 er vist i figur 18.

30

Insersjon av humaniserte hTNF40 variable regioner inn i pTTO-2

Variabel lett kjede regionen hTNF40gL1 (SEQ ID NO:8) ble oppnådd ved PCR
 "rescue" fra den tilsvarende vektor for pattedyrcelleekspressjon pMR10.1. OmpA
 35 ledersekvensen erstatter den native Ig leder. Sekvensen til PCR primerne er vist
 under:

5' primer:

**CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAG
CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEQ ID NO:79)**

3' primer: TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEQ ID NO:80)

Etter PCR under standard betingelser ble produktet renset, kuttet med enzymer MunI og SplI, deretter gelrenset. De rensede fragment ble deretter insertert inn i
5 MunI/SplI setene av pTTO-2 for å danne lett kjede mellomproduktet pTTO(htTNF40L).

Variabel tung kjede regionen av gh3hTNF40.4 ble oppnådd på samme måte fra vektoren pGamma-4. Sekvensen til PCR primerne er vist under:

10

5' primer:

**GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG
CTGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEQ ID NO:81)**

3' primer: GCCTGAGTTCCACGACAC (SEQ ID NO:82)

Etter PCR ble produktet renset, kuttet med enzymer NheI og ApaI og deretter subklonet inn i vektoren pDNAEng-G1 (figur 19). Etter verifikasjon ved DNA sekvensering, ble den tunge kjede underkastet restriksjon med enzym EcoRI og
15 sub-klonet inn i EcoRI setet av pTTO(htTNF40L) for å danne *E. coli* ekspresjonsplasmidet pTTO(htTNF40).

Optimalisering av intergenisk sekvens for modifisert Fab ekspresjon

20 I pTTO vektoren forekommer modifisert Fab ekspresjon fra en di-cistronisk message som først koder for lett kjede og deretter tung kjede. DNA sekvensen mellom de to genene (intergenisk sekvens, IGS) kan innvirke på ekspresjonsnivået av den tunge kjede ved å påvirke translasjonsinitieringsraten. En kort intergenisk sekvens kan for eksempel resultere i translasjons-kobling mellom de lette og tunge
25 kjeder, ved at det translaterende ribosom muligens ikke dissosierer fullstendig fra mRNA etter komplettering av lett kjede syntese før initiering av tung kjede syntese. "Styrken" av et hvilket som helst Shine Dalgarno (SD) ribosom bindingssete (homologi til 16S rRNA) kan også ha en effekt, og likeså distansen og sekvenssammensetningen mellom SD og ATG startkodonet. Den potensielle

sekundære struktur av mRNA rundt ATG er en annen viktig faktor, idet ATG bør være i en "sløyfe" og ikke sperret inne i en "stamme", mens det motsatte gjelder for SD. Således ved modifisering av sammensetning og lengde av IGS er det mulig å modifisere styrken av translasjonsinitiering og derfor nivået av tung kjede 5 produksjon. Det er sannsynlig at en optimal translasjonsinitieringsrate må oppnås for å maksimere ekspresjon av den tunge kjede til et gitt modifisert Fab. Med et modifisert Fab kan for eksempel et høyt ekspresjonsnivå tolereres, men for et annet modifisert Fab med en annen aminosyresekvens vil et høyt ekspresjonsnivå vise seg å være toksisk, kanskje på grunn av forskjellige effektiviteter med hensyn 10 til sekresjon eller folding. På grunn av dette, ble en serie av fire intergeniske sekvenser designet (figur 20), som tillater den impriske bestemmelse av den optimale IGS for hTNF40-basert modifisert Fab. IGS1 og IGS2 har svært korte intergeniske sekvenser (henholdsvis -1 og +1) og vil kunne forventes å gi nær koblet translasjon, idet Sd sekvensene (understreket) er hårfint forskjellige. Disse 15 to sekvenser vil sannsynlig gi et høyt translasjonsinitieringsnivå. IGS3 og IGS4 har en lenger avstand mellom start- og stopp-kodoner (+13) og avviker i deres sekvenssammensetning, idet IGS3 har en "sterk" SD sekvens. Alle sekvenser ble studert for sekundærstruktur (ved anvendelse av m/fold-program) og "optimalisert" i den grad det er mulig, men med tett translasjonskopling av de to kjedene betyr 20 mangel på ribosomal dissosiasjon imidlertid at mRNA muligens ikke er "naken", og forebygger sekundærstrukturdannelse.

Kloning av IGS varianter

25 IGS kassetene vist i figur 20 har flankerende SacI og MunI klonings seter. De ble bygget ved å anneale komplementære oligonukleotidpar. Et vektorfragment ble fremstilt ved å kutte pTTO(hTNF40) med SacI og NotI, og et tung kjede fragment ble fremstilt ved å kutte pDNA_{EngG1}(hTNF40H) med MunI og NotI. Tre-veis 30 liggeringer ble deretter utført ved anvendelse av ekvimolare mengder av de to restriksjonsfragmenter og omtrent 0,05 pmol av hver annealede oligo kasset. Dette dannet de fire ekspresjonsplasmider pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS-4).

Rystekolbe-ekspresjonsanalyse

35

De fire plasmider ble transformert inn i *E. coli* stamme W3110 sammen med det originale ekspresjonskonstrukt, og ble deretter analysert for ekspresjon i rystekolber som beskrevet. Resultatene fra et typisk forsøk er vist i figur 21. De

forskjellige intergeniske sekvenser gir ulike ekspresjonsprofiler. IGS1 og IGS2 akkumulerer periplasmisk modifisert Fab hurtig med en topp 1 time etter induksjon, hvoretter nivået som her fremkommer faller. Toppen er større og faller raskere for IGS1. Disse resultater er konsistent med et høyt syntesenivå, som forventet for nær translasjonskobling for disse konstrukter. IGS1 gir tilsynelatende et høyere nivå av tung kjede ekspresjon enn IGS2 gjør. I denne forbindelse, fremgår det at dette høye ekspresjonsnivå tolereres dårlig, da periplasmiske ekspresjonsnivåer faller etter 1 time toppen. Dette ser man på vekstprofilen av IGS1 kulturen (ikke vist), som har en topp 1 time etter induksjon før den faller, som foreslår celledød og lysis. IGS3 akkumulerer modifisert Fab saktere men har en topp 2 timer etter induksjon med en høyere toppverdi (325 ng/ml/OD), før nivåene faller. Veksten for denne kultur fortsetter 3 timer etter induksjon og når en høyere topp-biomasse (ikke vist). Dette er konsistent med et lavere nivå av tung kjede syntese. IGS4 akkumulerer likevel material ved en langsommere hastighet og mislykkes i å nå den høye produktivitetstopp til de andre 3 konstrukter. Alle IGS varianter gjør det signifikant bedre enn den opprinnelige vektor. Hypotesen om at de forskjellige sekvenser gir forskjellige grader av translasjonsinitiering understøttes av disse forsøksresultater. For det hTNF40-baserte modifiserte Fab fremgår det at en høy grad av tung kjede translasjonsinitiering tolereres dårlig og er derfor ikke optimal. En langsommere rate, som gitt ved IGS3, resulterer i bedre vekstegenskaper og følgelig akkumulerer et større utbytte over tid.

Etter sammenligning av produktivitet i fermentoren ble IGS3 konstruktet selektert som det beste og ble betegnet pTTO(CDP870), se figur 22.

25

Den tunge kjede kodet for av plasmidet pTTO(CDP870) har sekvensen gitt i SEQ ID NO:115 og den lette kjede har sekvensen gitt i SEQ ID NO:113.

PEGylering av CDR-podet, hTNF40-basert modifisert Fab

30

Det rensede modifiserte Fab konjugeres sete-spesifikt med et forgrenet molekyl av PEG. Dette oppnås ved aktivering av en enkel cysteinrest i en trunkert hengselregion av det modifiserte Fab, etterfulgt av reaksjon med (PEG)-lysymaleimid som tidligere beskrevet (A.P. Chapman *et al.*, Nature Biotechnology 35 17, 780-783, 1999). Det PEGylerte molekyl er vist i figur 13 og betegnes forbindelse CDP870.

Effektivitet av PEGylert CDR-podet, hTNF40-basert modifisert Fab (CDP870) for å behandle reumatoid artritt.

CDP870 har en lang halveringstid på omtrent 11 dager.

5

Man har evaluert sikkerhet og effektivitet av intravenøs CDP870 i et randomisert dobbel-blind placebokontrollert dose- eskalerende forsøk i pasienter med RA.

Metoder

10

Pasienter.

Pasienter i en alder mellom 18 og 75 år og som tilfredsstilte de 1987 reviderte American College of Rheumatology (ACR) diagnostiske kriterier for reumatoid artritt (RA) (Arnett *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 31, 315-324, 1988) ble rekruttert fra polikliniske reumatologiklinikker i London, Cambridge, Norfolk og Norwich (United Kingdom). Pasienter måtte ha en klinisk aktiv sykdom som definert ved å ha minst 3 av de etterfølgende kriterier: ≥ 6 smertefulle eller ømme ledd, ≥ 45 minutter tidlig morgenstivhet, og erytrocytt sedimenteringshastighet (ESR) ≥ 28 mm/t. De må ha mislykkes i å respondere på minst ett Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug (DMARD) og de har vært ute av behandling i minst 4 uker. Kortikosteroider ble tillatt dersom dosen var $\geq 7,5$ mg/dag av prednisolon. Gravide kvinner, ammende kvinner og kvinner som har potensial til å få barn som ikke brukte en effektiv prevensjonsmetode ble utelukket. Pasienter ble også utelukket dersom de hadde en tidligere historie vedrørende malignitet, samtidige alvorlige ukontrollerte medisinske tilstander, tidligere svikt i TNF α -nøytraliserende terapi eller allergi overfor polyetylenglykol. Skrevne informative samtykker ble oppnådd fra hver pasient før innskriving. Studiet ble godkjent av de lokale forsknings-etikk-komiteer.

30

Behandlingsprotokoll:

36 RA pasienter ble oppdelt i 3 grupper som hver mottok en økende dose av forsøkslegemiddelet (1,5 eller 20 mg/kg). Hver gruppe på 12 ble oppdelt tilfeldig i 35 8 for å motta CDP870 og 4 for å motta placebo. CDP870 ble gitt som en enkelt intravenøs infusjon (totalt 100 ml) i løpet av 60 minutter. Placebo (natriumacetatbuffer) ble likeledes gitt som en enkelt intravenøs infusjon på 100 ml i løpet av 60 minutter. Behandling ble gitt på en poliklinisk basis. Etter 8 uker

hadde alle pasienter muligheten til å motta en infusjon av enten 5 eller 20 mg/kg CDP870 valgfritt.

Klinisk vurdering:

5

RA sykdomsaktivitet ble vurdert på grunnlag av the World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology (Boers *et al.*, J. Rheumatol - Supplement, 41, 86-89, 1994) og European League Against Rheumatism (EULAR) Scott *et al.*, Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) kjernedatasett med 28 leddtelling. Forandringer i sykdomsaktivitet ble vurdert ved Disease Activity Score (Prevoo *et al.*, Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) og ACR responskriteriene (Felson *et al.*, Arthritis Rheum., 38, 727-735, 1995). Vurderinger ble gjennomført før behandling og 1, 2, 4, 6 og 8 uker etter terapi. Pasienter ble også vurdert med hensyn til sikkerhet og toleranse av det legemiddel som studeres. Hematologi, biokjemi, anti-CDP870 antistoffer og bivirkninger ble vurdert ved hvert besøk.

CDP870 plasmakonsentrasjon og anti-CDP870 antistoffer:

20 CDP870 ble målt ved "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Seriefortynninger av pasientenes plasma ble inkubert i mokrotiterplater (Nunc) belagt med rekombinant human TNF α (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). Innfanget CDP870 ble vist med pepperrotperoksydase-konjugert geit anti-human kappa lett kjede (Cappel, ICN) etterfulgt av tetrametylbenzidin (TMB) substrat. 25 Antifstoffer overfor CDP870 ble screenet (ved 1/10 plasmafortynning) ved anvendelse av en dobbel antigen sandwich ELISA med biotinyllert CDP870 som det andre lag. Bundne antistoffer ble vist ved anvendelse av HRP-streptavidin og TMB substrat. Analysen ble kalibrert ved anvendelse av en hyperimmun kanin IgG standard. En aktivitetseenhet er ekvivalent med 1 μ g av kaninstandard. 30

Statistisk analyse

Studiet var eksplorativt av natur og prøvestørrelsen var basert på et tidligere forsøk med tilsvarende midler. Effektivitet av CDP870 ble analysert ved å beregne sykdomsaktivitets-score (DAS) og ACR20/50 responser for "intention to treat" og per-protokoll ved anvendelse av en lukket forsøksprosedyre. Sykdomsaktivitetsscoren ble beregnet som følger: $DAS = 0,555 \times \sqrt{\text{av (28$

ømme ledd) + 0,284 x kvadratrot av (28 hovne ledd) + 0,7 x ln(ESR) + 0,0142 x (pasientens globale vurdering). Først ble de samlede aktive grupper sammenlignet med placebo. Dersom denne sammenligning var signifikant ved 5% nivået, ble hver doseringsgruppe sammenlignet med placebo. Alle sammenligninger var to-halet med et signifikansnivå på 5%. Alle P-verdier ble avledet fra eksplorative analyser og bør ikke anvendes for inferenstolkning.

Resultater

10 Demografi:

36 pasienter med RA ble rekruttert. Deres demografiske detaljer er gitt i tabell 6. Gjennomsnittsalderen var 56 år og 30 pasienter var kvinner. Den gjennomsnittlige varighet av RA var 13 år og 21 pasienter var reumatoid-faktor positive. Pasienter i de forskjellige grupper har tilsvarende demografiske egenskaper. I blind-doseringsperioden, trakk 6/12 placebobehandlede pasienter seg fra studiet på grunn av forverrende RA \geq 4 uker etter dosering. 2/24 CDP870-behandlede pasienter trakk seg, begge i 1 mg/kg gruppen, med hensyn til forverrende RA/forsvunnet for oppfølging mer enn 4 uker etter dosering. Forskjellen var statistisk signifikant ($p=0,009$, Fisher nøyaktighetstest).

Tabell 6: Demografiske detaljer (gjennomsnitt \pm standard avvik)

	Antall	Kjønn (M:K)	Alder	Sykdoms- varig- het	Reuma- toid faktor	Antall tid- ligere DMARDer
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

Klinisk effektivitet:

Den andel av pasienter med ACR20 forbedring for per-protokoll populasjonen med siste observasjon overført var

- 5 16,7, 50, 87,5 og 62,5% etter placebo, 1,5 og 20 mg/kg CDP870 (kombinert behandlingseffekt $p=0,012$) ved 4 uker og 16,7, 25,75 og 75% ($p=0,032$) ved 8 uker. Reduksjon i DAS score (median) for pre-protokoll populasjonen med siste observasjon overført var 0,15, 1,14, 1,91 og 1,95 etter placebo, 1,5 og 20 mg/kg CDP870 (kombinert behandlingseffekt $p=0,001$) ved 4 uker og 0,31, 0,09, 2,09 og 10 1,76 ($p=0,008$) ved 8 uker (figur 23). Forandringer i individuelle komponenter i "the World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology" kjernedatasett er vist i figur 24.

Etter den åpne merkedose av CDP870 ble lignende fordelaktige effekter oppnådd. 15 Av de 36 pasientene som var rekruttert inn i studiet, mottok 32 en andre infusjon av CDP870. Andelen av pasienter med ACR20 forbedring fra pre-første infusjon var 72,2 og 55,6% etter 5 og 20 mg/kg CDP870 ved 4 uker og 55,6 og 66,7% ved 8 uker.

20 *Bivirkninger*

- Behandling ble godt tolerert uten infusjonsrelatert reaksjon. Ingen allergisk reaksjon eller hudutslett ble rapportert. I dobbel-blindfasen, var det 19, 38, 8 og 14 bivirkninger i henholdsvis placebo og 1,5 og 20 mg/kg gruppene. Det vanligste 25 var hodepine med 9 episoder i 5 pasienter (1 placebo, 3 ved 1 mg/kg, 1 ved 20 mg/kg). En pasient som mottok placebo og 3 pasienter som mottok CDP870 (1 ved 5 mg/kg og 2 ved 20 mg/kg) utviklet infeksjoner i nedre luftveier. Disse ble rapportert som milde eller moderate. De ble behandlet oralt med antibiotika og plagene forsvant i løpet av 1-2 ukers periode. Tre pasienter i hver av gruppene 1 30 og 5 mg/kg og en i gruppen 20 mg/kg utviklet en urinveisinfeksjon 1-2 måneder etter CDP870 behandling.

- En bivirkning ble beskrevet som alvorlig som er en episode med nakkesmerter som forekom 3 dager etter infusjon med 1 mg/kg. Økning i anti-nukleært antistoff 35 ble sett i 4 pasienter: 1 i placebogruppen (negativ til 1/40), 2 i 1 mg/kg gruppen (negativ til 1/40, negativ til 1/80) og 1 i 20 mg/kg gruppen (negativ til 1/40). Ingen forandring ble funnet i anti-DNA eller anti-kardiolin antistoffer.

CDP870 plasmakonsentrasjon og anti-CDP870 nivåer.

Som forventet for alle dosenivåer av CDP870, forekom topp-plasmakonsentrasjonen på slutten av infusjonen og var doseproporsjonal med plasmakonsentrasjon som deretter sakte avtar. Plasmakonsentrasjonsprofilen for CDP870 viser seg å være tilsvarende den som tidligere er observert i frivillige hvor halveringstiden ble beregnet til å være omtrent 14 dager. Ved re-dosering ble en tilsvarende profil som enkeltdose infusjon observert.

Etter en enkelt intravenøs infusjon var anti-CDP870 nivåer lave eller ikke detekterbare.

Diskusjon

Nøytralisering av TNF α er en effektiv behandlingsstrategi i RA. Dette krever for tiden anvendelse av biologiske midler, slik som et kimært mAb eller et oppløselig reseptor/humant Fc fusjonsprotein, som er kostbare å fremstille. Et terapeutisk TNF α nøytraliserende middel må binde TNF α med høy affinitet og ha en lang plasma-halveringstid, lav antigenisitet og høy tolererbarhet og sikkerhet. Det må også være tilgjengelig for alle pasienter med RA som vil ha fordel av TNF α blokade. En teknologi som vil kunne oppnå disse formål er konjugeringen med polyetylenglykol av et TNF α bindende antistoff-fragment dannet i *E. coli*. I dette preliminare studium har man funnet at CDP870, et PEGylert, anti-TNF α , modifisert Fab, er effektivt og godt tolerert av pasienter med RA.

In vitro studier har vist av CDP870 har tilsvarende TNF α nøytraliserende aktivitet som det murine anti-TNF α moderantistoff. Dette studium bekrefter at CDP870 reduserte inflammasjon og forbedret symptomer i RA. Klinisk forbedring som målt ved ACR20 responskriteriene i 5 og 20 mg/kg gruppene (75%, 75%) var sammenlignbare med etanercept (60%) (Moreland *et al.*, *Annals Int. Med.*, 130, 478-486, 1999) og infliksimab (50%) (Maini *et al.*, *Lancet*, 354, 1932-1939, 1999). Ved de mellomste og høyeste doseringsnivåer som ble testet, varte den terapeutiske effekt 8 uker som er sammenlignbar med tidligere andre mAb-er (Elliott *et al.*, *Lancet*, 344, 1105-1110, 1994 og Rankin *et al.*, *Br. J. Rheumatol*, 34, 334-342, 1995). Tidligere studium har vist at den terapeutiske effekt av anti-TNF α antistoffer er relatert til plasma-halveringstiden derav og dannelsen av sirkulerende antistoffer (Maini *et al.*, *Arthritis Rheum.* 38, (Supplement): S186 1995 (Abstract)). Vårt studium viste at CDP870 har en plasma-halveringstid på 14 dager som er

ekvivalent med den til et helt antistoff (Rankin *et al.*, (*supra*)) og mye lengre enn halveringstiden til ikke-konjugerte Fab' fragmenter. Videre dannet CDP870 kun svært lave nivåer av antistoffrespons.

- 5 Et av de viktige formål med dette studium er å undersøke tolererbarhet og sikkerhet i forbindelse med administrering av dette PEGylerte Fab'. I vårt studium synes CDP870 å være vel tolerert. Ytterligere studium vil dog være nødvendig for å vurdere langtids-toksisitet, særlig risikoen for demyelineringssykdom, infeksjon og hudutslett som er blitt rapportert med etanercept og infliksimab.

10

Oppsummert, er CDP870 terapeutisk effektiv i RA og er vel tolerert i dette kortidsstudium.

Det skal forstås at de ovenfor angitte eksempler skal tjene som eksempel og ikke begrense rammen for oppfinnelsen som definert i de etterfølgende krav.

Patentkrav

- 5 1. Antistoffmolekyl som har spesifisitet for human TNF α , som er et Fab-fragment, karakterisert ved at det omfatter en lett kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:113 og en tung kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:111.
2. Antistoffmolekyl som har spesifisitet for human TNF α , som er et Fab-fragment,
10 karakterisert ved at det har en lett kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:113 og en tung kjede som har sekvensen angitt i SEQ ID NO:111.
3. Antistoffmolekyl ifølge krav 1 eller 2, som er et modifisert Fab-fragment hvor modifikasjonen er addisjonen til den C-terminale enden av dets tunge kjede av én eller
15 flere aminosyrer for å tillate festing av et effektor- eller reporter-molekyl.
4. Antistoffmolekyl ifølge krav 3, som er et modifisert Fab-fragment hvor de ytterligere aminosyrer danner en modifisert hengselregion inneholdende én eller flere cysteinrester som effektor- eller reporter-molekylet kan være festet til.
20
5. DNA, karakterisert ved at det koder for den tunge og/eller lette kjeden til antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4.
- 25 6. DNA ifølge krav 5, omfattende sekvensen vist i SEQ ID NO:110 eller 112.
7. Klonings- eller ekspresjonsvektor, karakterisert ved at den inneholder DNAet ifølge krav 5 eller 6, hvor ekspresjonsvektoren eventuelt er en *E. coli* ekspresjonsvektor.
- 30 8. Vertscelle, karakterisert ved at den er transformert med vektoren ifølge krav 7.
9. Fremgangsmåte for fremstilling av antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, karakterisert ved at den omfatter dyrking av vertscellen ifølge krav 8 og isolering av antistoffmolekylet som er et
35 Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment.
10. Fremgangsmåte for fremstilling av antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller

modifisert Fab-fragment ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, karakterisert ved at den omfatter dyrking av *E. coli* omfattende en *E. coli* ekspresjonsvektor omfattende DNAet ifølge krav 5 eller 6, og isolering av antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment.

5

11. Fremgangsmåten for fremstilling av antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge krav 10, hvor antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment er målrettet mot periplasmaet.

10

12. Terapeutisk preparat, karakterisert ved at det omfatter antistoffmolekylet som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4.

15

13. Antistoffmolekyl som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, som har spesifisitet for human TNF α for anvendelse i behandling av en akutt eller kronisk immun eller immunregulerende lidelse, en infeksjon, en neurodegenerativ sykdom eller en malign sykdom.

20

14. Antistoffmolekyl som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge krav 13, for anvendelse i behandling av en inflammatorisk eller autoimmun lidelse.

15. Antistoffmolekyl som er et Fab-fragment eller modifisert Fab-fragment ifølge krav 14, for anvendelse i behandling av reumatoid artritt, osteoartritt, Crohn's sykdom eller psoriasis.

25

Sekvensliste

<110> CELLTECH CHIROSCIENCE LIMITED

<120> BIOLOGICAL PRODUCTS

<130> P021741WO

<140>

<141>

<160> 115

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH1

<400> 1

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH3

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

2

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRL1

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRL2

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRL3

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH2

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

Gly

<210> 8

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: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

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: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

4

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

<210> 10

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:gh1hTNF40.4 (Figure 10)

<400> 10

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

5

```

cag ggc aga gtc acg ttc act cta gac acc tcc aca agc act gca tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65                70                75                80

atg gag ctg tca tct ctg aga tcc gag gac acc gca gtg tac tat tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95

gct aga gga tac aga tct tat gcc atg gac tac tgg ggc cag ggt acc 336
Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                105                110

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

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: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 cgg 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 tot 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

```


6

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

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

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

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

<400> 12
 gccgccacc 9

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

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

<400> 13
 atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

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

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

<400> 14
 atgggatgga gctratatcat sytctt 26

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

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

<400> 15
 atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt 26

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

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

<400> 16
 atgractttg ggytcagctt grt 23

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

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

<400> 17
 atggactcca ggctcaattt agtttt 26

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

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

<400> 18
 atggctgtcy trgscttctt cttctg 26

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

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

<400> 19
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 25

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

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

<400> 20

atgagagtgc tgattctttt gtg 23

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

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

<400> 21
 atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

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

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

<400> 22
 atgggcagac ttacattctc attcct 26

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

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

<400> 23
 atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

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

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

<400> 24
 atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 25

gcgcgcaagc ttgccgccac c 21

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

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

<400> 26
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29

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

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

<400> 27
 atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

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

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

<400> 28
 atgagtgtgc tcaactcaggt cct 23

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

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

<400> 29
 atgaggrecc ctgctcagwt tyttgg 26

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

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

<400> 30
 atggatttwc aggtgcagat twtcagott 29

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

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

<400> 31 29
 atggatttwc argtgcagat twtcagctt

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

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

<400> 32 26
 atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg

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

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

<400> 33 23
 atgggcwtca agatggagtc aca

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

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

<400> 34 29
 atgtggggay ctktttycmm tttttcaat

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

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

<400> 35 24
 atggtrtcow casctcagtt cctt

<210> 36
 <211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 36
 atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

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

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

<400> 37
 atggaagccc cagtcagct tctctt 26

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

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

<400> 38
 atgragtywc agaccaggt cttprt 26

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

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

<400> 39
 atggagacac attctcaggt ctttgt 26

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

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

<400> 40
 atggattcac aggccaggt tcttat 26

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

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL14

<400> 41
atgatgagtc ctgcccagtt cctggt 26

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL15

<400> 42
atgaatttgc ctgttcacct cttggtgct 29

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL16

<400> 43
atggattttc aattggtcct catctcctt 29

<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17A

<400> 44
atgaggtgcc tarctsaagt cctgrg 26

<210> 45
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17B

<400> 45
atgaagtact ctgctcagtt tctag 26

<210> 46
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

 <400> 46
 atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

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

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

 <400> 47
 ggactgttcg aagccgccac c 21

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

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

 <400> 48
 ggatacagtt ggtgcagcat cgtacgtt 30

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

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

 <400> 49
 gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrqag acdgtga 37

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

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

 <400> 50
 gctgacagac taacagactg ttcc 24

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

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

<400> 51
gctctcggag gtgctcct 18

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

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

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

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

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

<400> 53
atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctgggt ttgctgata 60
ccaggctaag t 71

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

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

<400> 54
tacagtgcct ctttcctota tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggt 60
actgattca c 71

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

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

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

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

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7986

<400> 56

atttcgcoac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggtta 60
ctaaagtaga aatcaaactg acggaattc 89

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7981

<400> 57

gaattcaggy tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7980

<400> 58

gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R1053

<400> 59

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5350

<400> 60

tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5349

<400> 61

gcagatgggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R684

<400> 62

ttcaactgct catcagat 18

<210> 63

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer F7989

<400> 63

gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60
aattc 65

<210> 64

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer F7990

<400> 64

ggttaagaag cctggtgctt ccgtcaaagt ttcgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60
agaçtatggt a 71

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer F7991

<400> 65

ccaaccatc catttcaggc ctgtccccg ggçctgçttg acccaattca taccatagtc 60
tgtgaacag t 71

<210> 66

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7995

<400> 66

ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcacggt c 81

<210> 67

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7992

<400> 67

ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7993

<400> 68

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 69

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7994

<400> 69

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7988

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7987

<400> 71
gaattcggta cctggcccc agtagtccat 30

<210> 72
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7999

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

<210> 73
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P8000

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

<210> 74
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P8001

<400> 74
ccaaccatc catttcaggc cctttcccg ggctgctta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7997

<400> 75
ggaggtatgc tggtgacttg gatgtgtota gagagaacgt gaatctgcc ttgaa 55

<210> 76
<211> 62

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer P7998

<400> 76
 ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60
 at 62

<210> 77
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer P7993

<400> 77
 gaattcggta ccctggccc agtagtccat gccataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
 gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 78
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer P7996

<400> 78
 gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

<210> 79
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 79
 cgcgcggcaa ttgcagtggc ctggctggt ttcgctaccg tagcgcgaagc tgacattcaa 60
 atgaccaga gcc 74

<210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 80
 ttcaactgct catcagatgg 20

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

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

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

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

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

<400> 82
 gcctgagttc cacgacac 18

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

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

<400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

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

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

<400> 84
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 framework L4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 99

25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

26

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

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

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

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

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

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

<223> Description of Artificial Sequence:OmpA oligonucleotide adaptor

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

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

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

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

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

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

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

27

```

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
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:IGS cassette-2

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

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

<210> 104
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:IGS cassette-3

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

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

```

28

15

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 107

29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Grafted Heavy Chain for Fab

<400> 110
 gaggttcagc tggctcgagtc aggaggcggg ctcgctgcagc ctggcgggac actgagattg 60
 tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
 ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaataactt acattggaga gcctatztat 180
 gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
 ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
 agatccttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catcggctctt ccccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg toctacagtc ctcaggactc 540
 tactocctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacac 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagt

648

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

<220>
 <223> Grafted Heavy Chain for Fab

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

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

<220>

<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 112

```

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

```

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 113

```

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

```

```

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

```

```

<210> 114
<211> 687
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Grafted Heavy Chain for Modified Fab

```

```

<400> 114
gaggttcagc tggctcgagtc aggaggcggg ctcggtgcagc ctggcgggac actgagattg 60
tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180
gctgacacg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac acogcagtg actattgtgc tagaggatac 300
agatcttatg ccattggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tggggggcaca 420
gcggccttgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 687

```

```

<210> 115
<211> 229
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Grafted Heavy Chain for Modified 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

```

33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Ala Ala
 225

1/27

FIG. 1

SAMMENLIKNINGER AV RAMMEREJONER AV LETT KJEDE AV
ANTISTOFF hTNF40 OG HUMAN GRUPPE 1 KONSENSUS-SEKVENSER

Hu gruppe 1 konsensus : DIQNTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO: 83)

hTNF40 : DIYMTQSQKEMSTSVGDRVSYTC (SEQ ID NO: 84)

Hu gruppe 1 konsensus : WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)

hTNF40 : WYQQKPGQSPKALY (SEQ ID NO: 86)

Hu gruppe 1 konsensus : GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)

hTNF40 : GVFYRFSGSGSDFTLTISTVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO: 88)

Hu gruppe 1 konsensus : FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 89)

hTNF40 : FGAGTKLEIKR (SEQ ID NO: 90)

FIG. 3 Sekvens av CDRer av hTNF40

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2' WINTYIGEPYADSVKG (SEQ ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

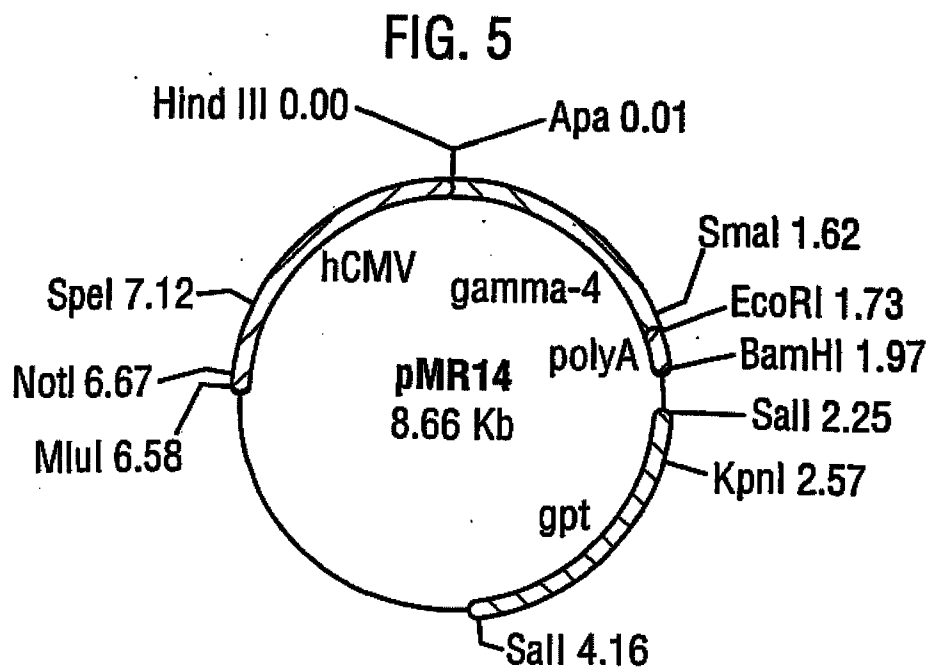
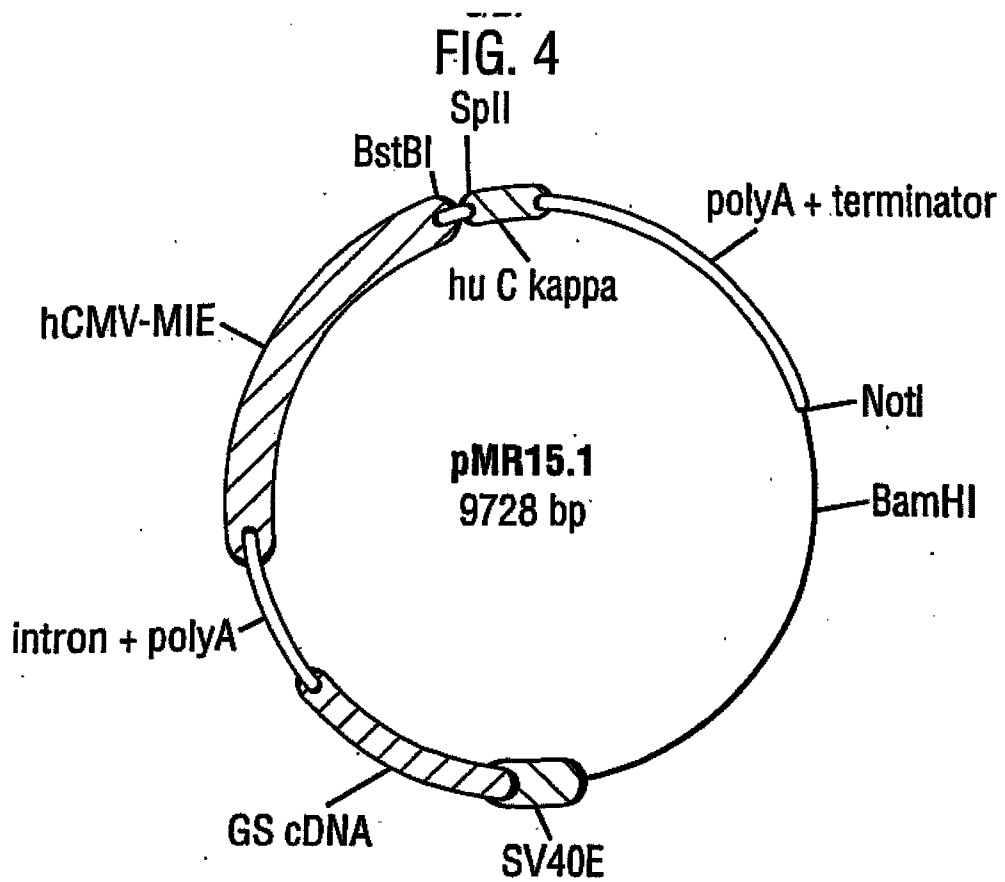
2/27

FIG. 2

SAMMENLIKNINGER AV RAMMEREJONER AV TUNG KJEDE AV ANTISTOFF
HTNF40 OG HUMAN GRUPPE 1 OG GRUPPE 3 KONSENSUS-SEKVENSER

Hu gruppe 1 konsensus	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	(SEQ ID NO: 91)
HTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETV</u> KI SCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
Hu gruppe 1 konsensus	: WVRQAPGQGLEWVG	(SEQ ID NO: 93)
HTNF40	: <u>WVKQAPGKAFK</u> WVG	(SEQ ID NO: 94)
Hu gruppe 1 konsensus	: RVTITRDITSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 95)
HTNF40	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINNLK</u> NEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu gruppe 1 konsensus	: WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO: 97)
HTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)
Hu gruppe 3 konsensus	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 106)
HTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETV</u> KI SCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
Hu gruppe 3 konsensus	: WVRQAPGKGLEWVS	(SEQ ID NO: 107)
HTNF40	: <u>WVKQAPGKAFK</u> WVG	(SEQ ID NO: 94)
Hu gruppe 3 konsensus	: RFTISRDNKNTLYLQMSLRRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 108)
HTNF40	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINNLK</u> NEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu gruppe 3 konsensus	: WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO: 109)
HTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)

3/27



4/27

FIG. 6 Murin VI sekvens av hTNF40 (SEQ ID NO: 99)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG
CTG TAA CAC TAC TGG GTC AGA GTT TTT AAG TAC AGG TGT AGT CAT CCT CTG TCC
D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R>

60      70      80      90      100
GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT
CAG TCG CAG TGG ACG TTC CCG TCA GTC TTA CAC CCA TGA CAT CCG ACC ATA
V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y>

110     120     130     140     150     160
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT CCA 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>

```


5/27

FIG. 7 Murin Vh sekvens av hTNF40 (SEQ ID NO: 100)

```

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

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

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

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

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

280     290     300     310     320
ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA GGT TAC CGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG
TGC CGA TGT ATA AAG ACA 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>

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

```

6/27

FIG. 8 Podet VI sekvens av hTNF40 (SEQ ID NO: 8)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG AGG 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 TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

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

```

7/27

FIG. 9 Podet VI sekvens av hTNF40 (SEQ ID NO: 9)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC 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 CTC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT GAG GAG TAG ATG TCA CCG AGA AAG GAG
Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   S   A   S   F   L>

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

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

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

```

8/27

FIG. 10 Podet Vh sekvens av hTNF40 (SEQ ID NO: 10)

```

10  CAG GTC CAG CTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GCT TCC GTC
20  GTC CAC GTC GAC CAG GTC AGT CCT CCG CAA TTC TTC GGA CCA CGA AGG CAG
30  Q V Q L V Q S G A E V X K P G A S V>
40
50
60  AAA GTT TCG TGT AAG GCC TCA GGC TAC GTG JTC ACA GAC TAT GGT ATG AAT TGG
70  TTT CAA AGC ACA TTC CCG AGT CCG ATG CAC AAG TGT CTG ATA CCA TAC TTA ACC
80  K V S C K A S G Y V F T D Y G M N W>
90
100
110 120 130 140 150 160
GTC AGA CAG GCC CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG AIT 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 Q G L E W M G N I N T Y>
170 180 190 200 210
ATT GGA GAG CCT AYT TAT GCT CAA AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG 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 Y S T A Y M E L S L R S E D>
280 290 300 310 320
ACC GCA GTS TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
TGG CGT CAC ATG ATG ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CCG TAC CTG ATG ACC
T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>
330 340 350
GBC 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>

```

9/27

FIG. 11 Podet Vh sekvens av hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11)

```

10      20      30      40      50
GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCA GGA GGC GGT CTC GTG CAG CCT GGC GGA TCA CTG
CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGT CCT CCG CCA GAG CAC GTC GGA CCG CCT AGT GAC
E V Q L V E S G G L V Q P G G 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 AIT TAT GCT GAC AGC GTC AAG GGC AGA TTC ACG TTC TCT CTA
TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA CTG TCG CAG TTC CCG TCT AAG TGC AAG AGA GAT
I G E P I Y A D S V K G R F T F S L>

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

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

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

```

10/27

FIG. 12

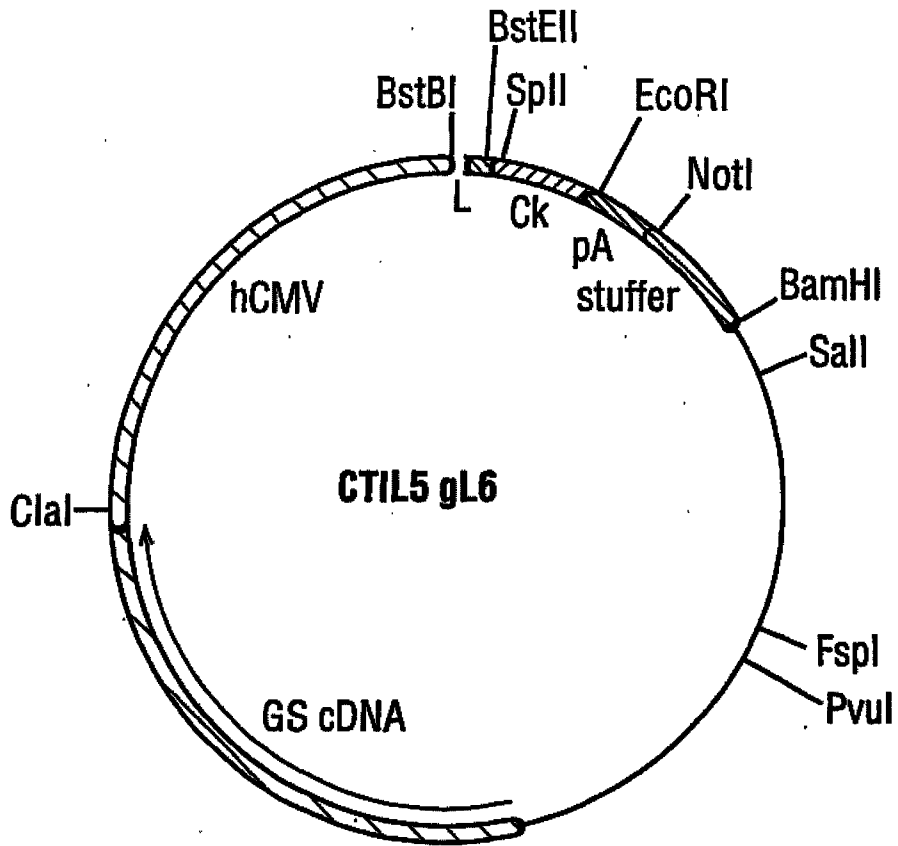
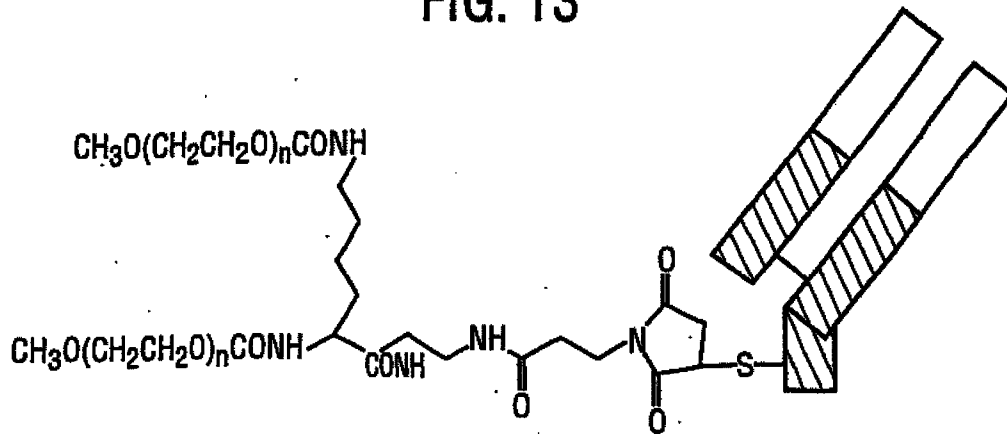
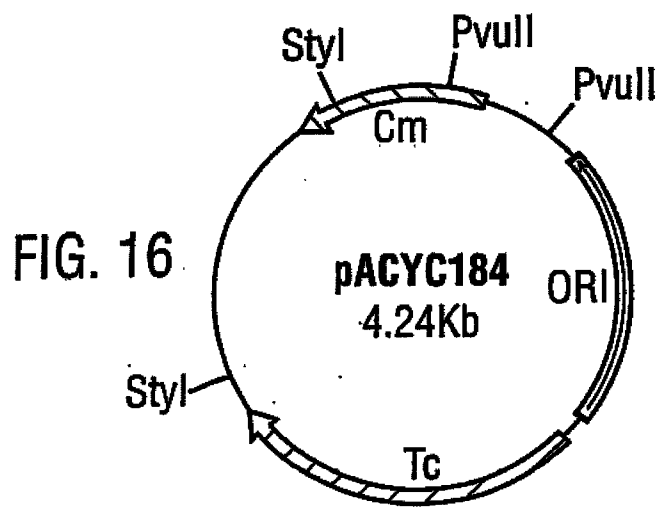
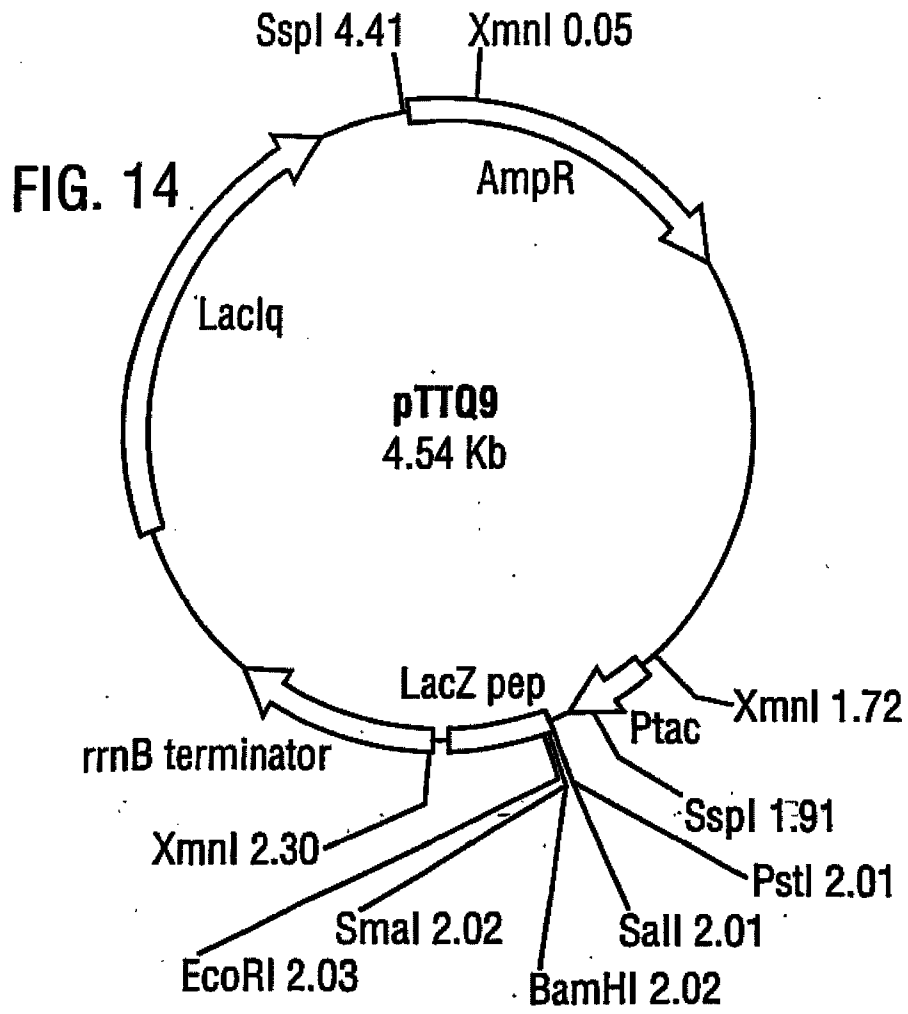


FIG. 13



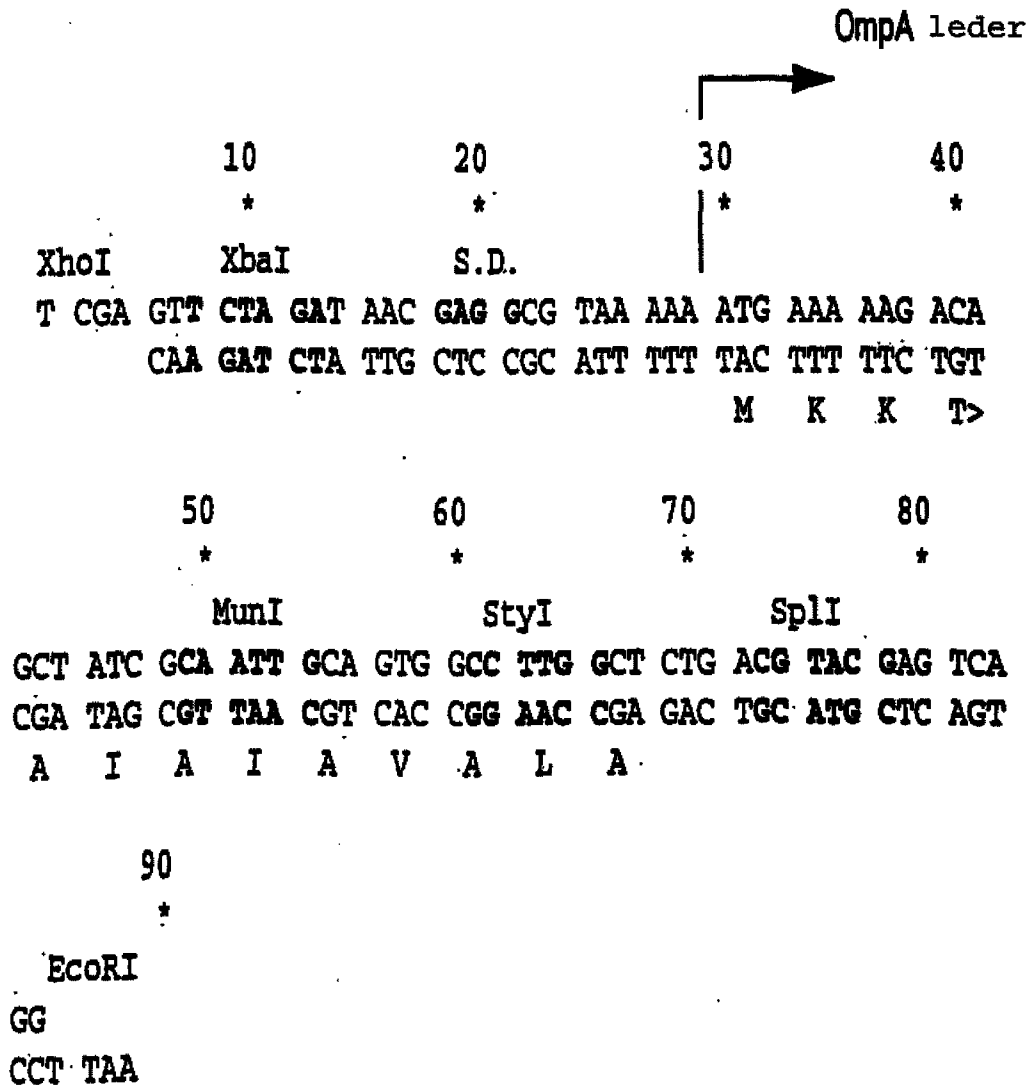
11/27



12/27

FIG. 15

Sekvens av OmpA oligonukleotid-adapter (SEQ ID NO: 101)



- Interne restriksjonsseter er vist med uthevet skrift
- Den 5' XhoI kohesive ende ligger inn i vektor Sall setet, blokkerer det
- S.D. representerer OmpA Shime Dalgarno sekvensen

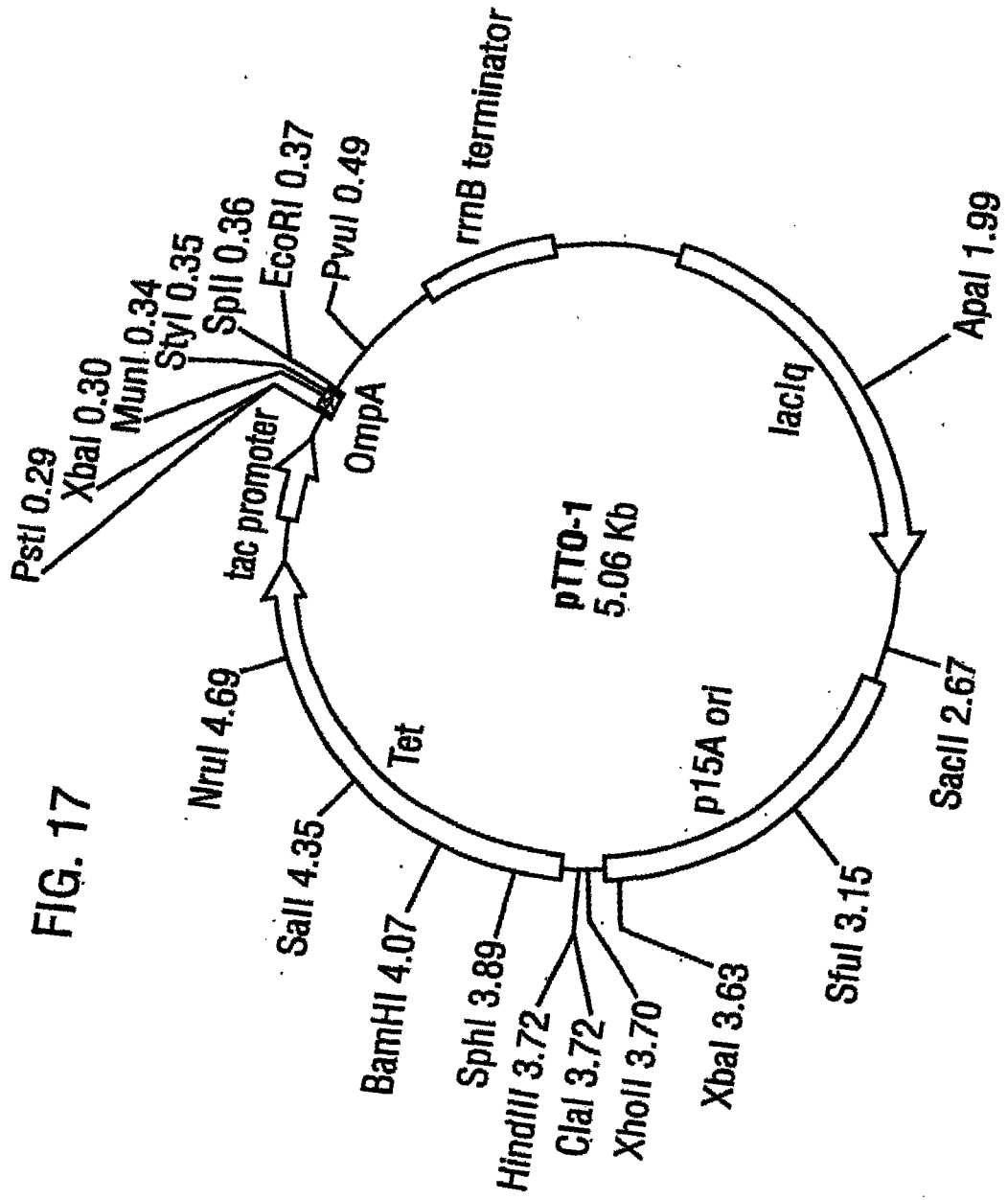


FIG. 17

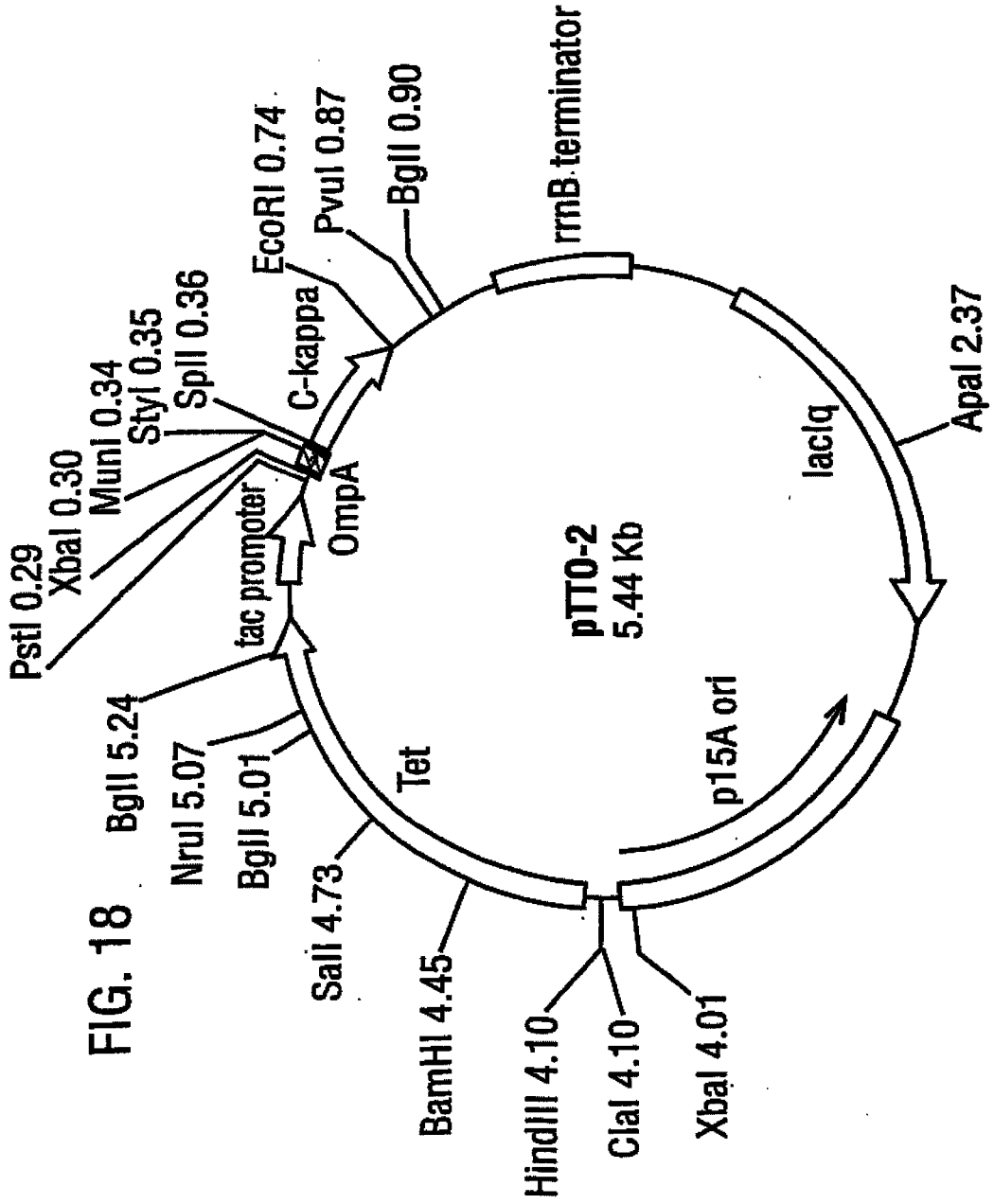


FIG. 18

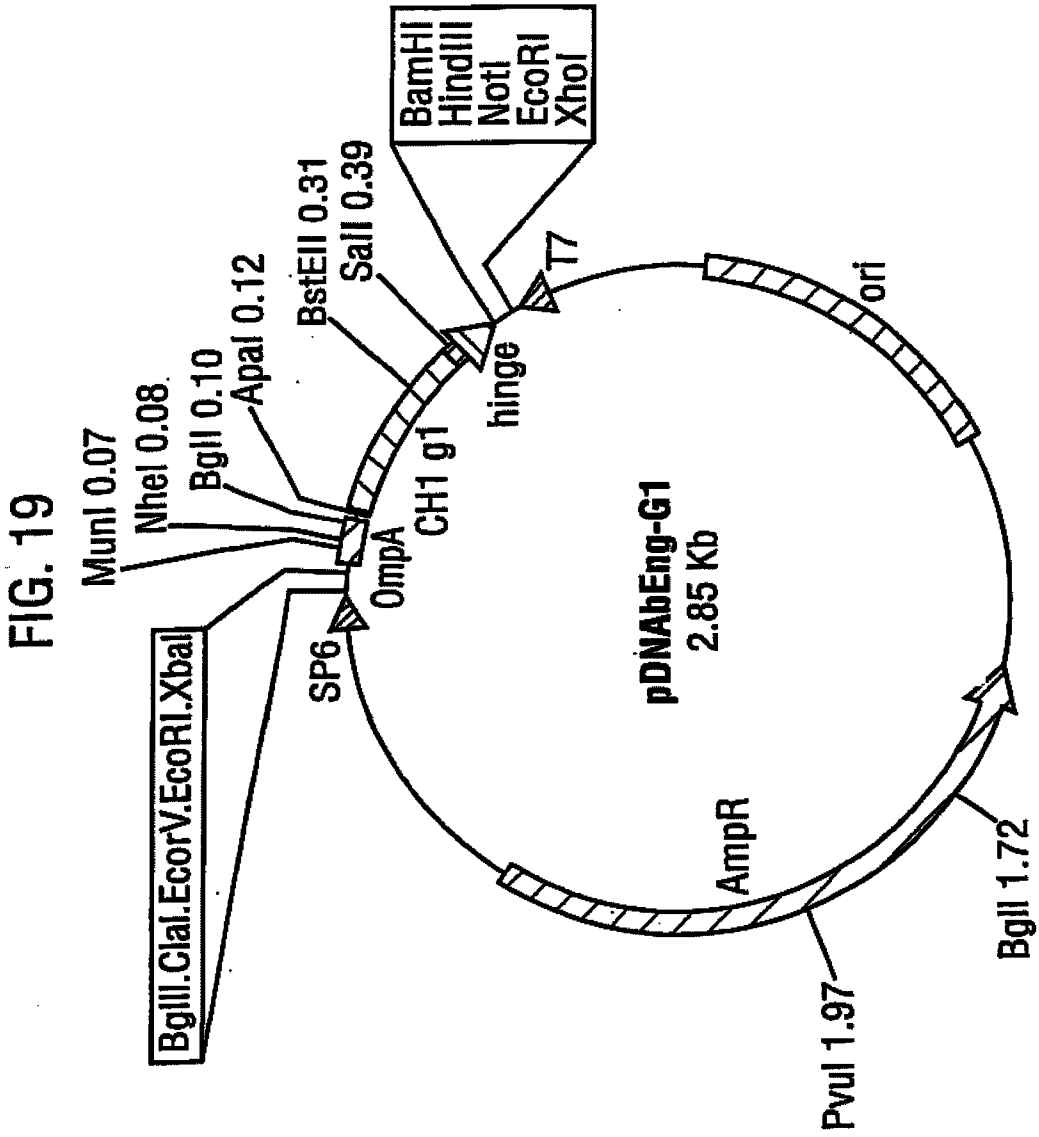


FIG. 20 OLIGONUKLEOTID-KASSETTER SOM KODER FOR FORSKJELLELIGE INTERGENISKE SEKVENSER FOR
E. Coli Fab' EKSPRESJON

IGS KASSETT-1; Intergenisk space = -1

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

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

Ende av c-Kappa sekvens -> Start på OmpA sekvens ->

IGS KASSETT-2; Intergenisk space = +1

G, ACC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA, AATG, ANG, ANG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 103)

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

16/27

IGS KASSETT-3; Intergenisk space = +13

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

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

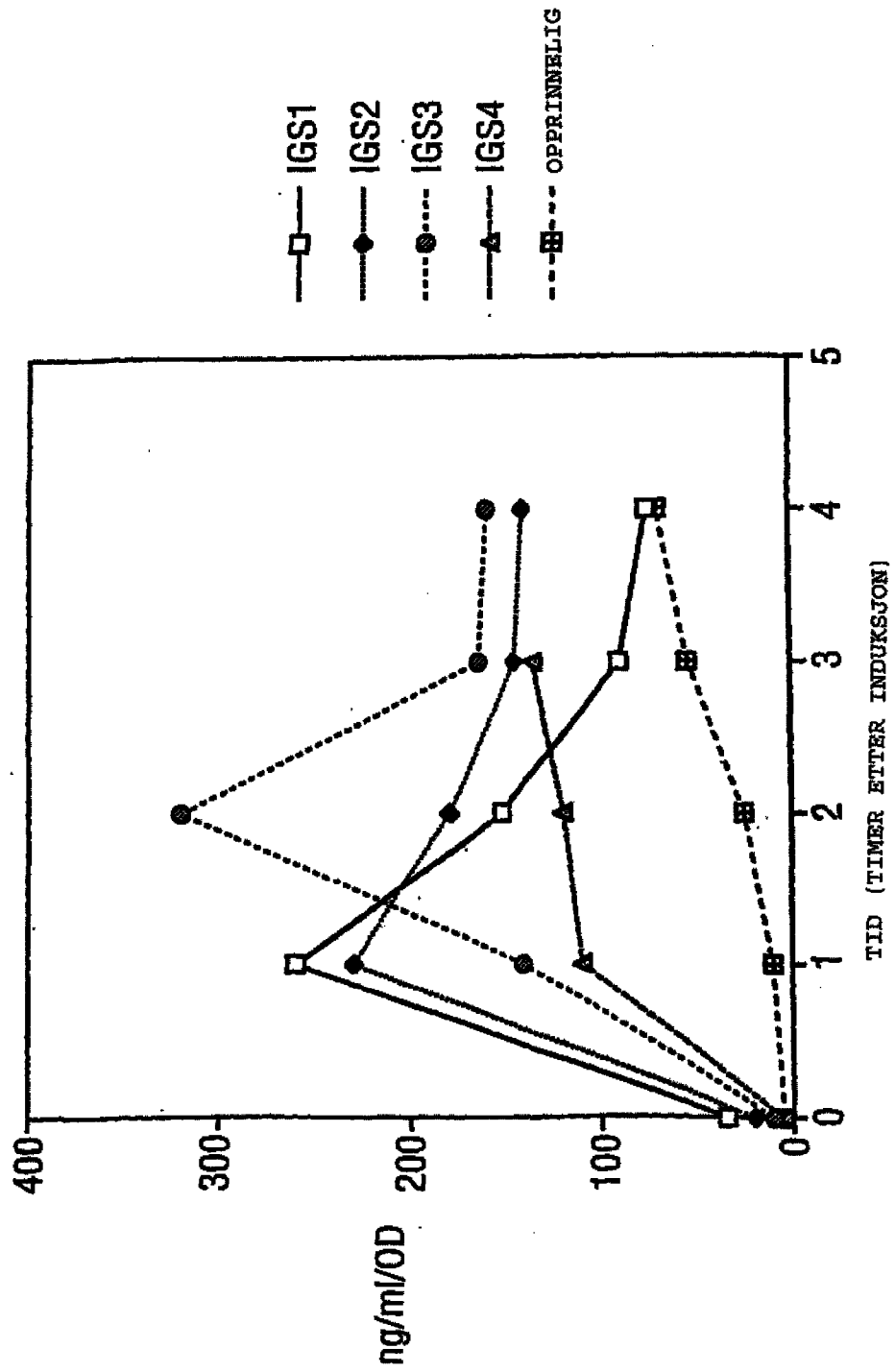
IGS KASSETT-4; Intergenisk space = +13

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

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

17/27

FIG. 21 periplasmisk Fab' akkumulering - IGS varianter



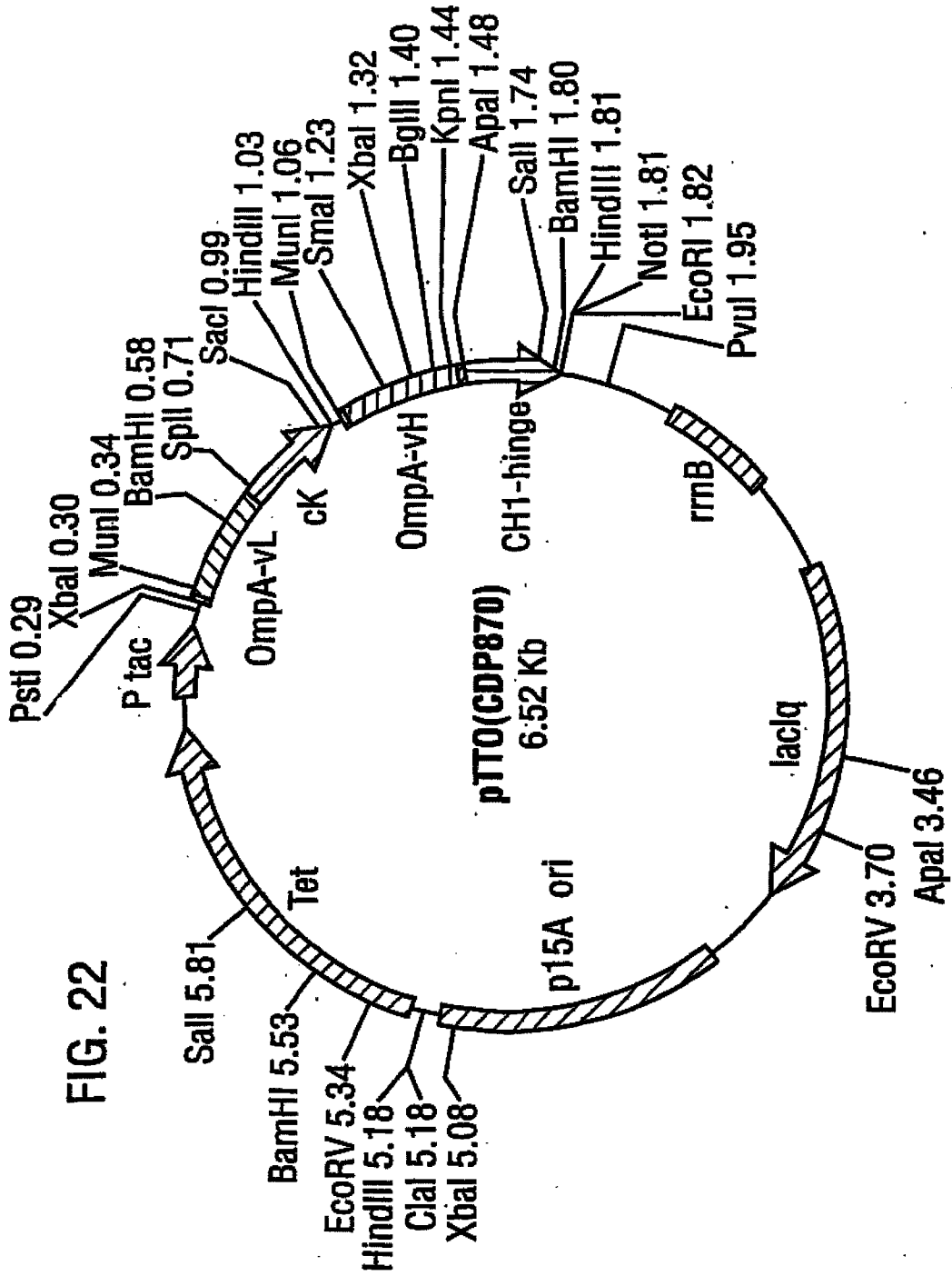


FIG. 22

FIG. 23

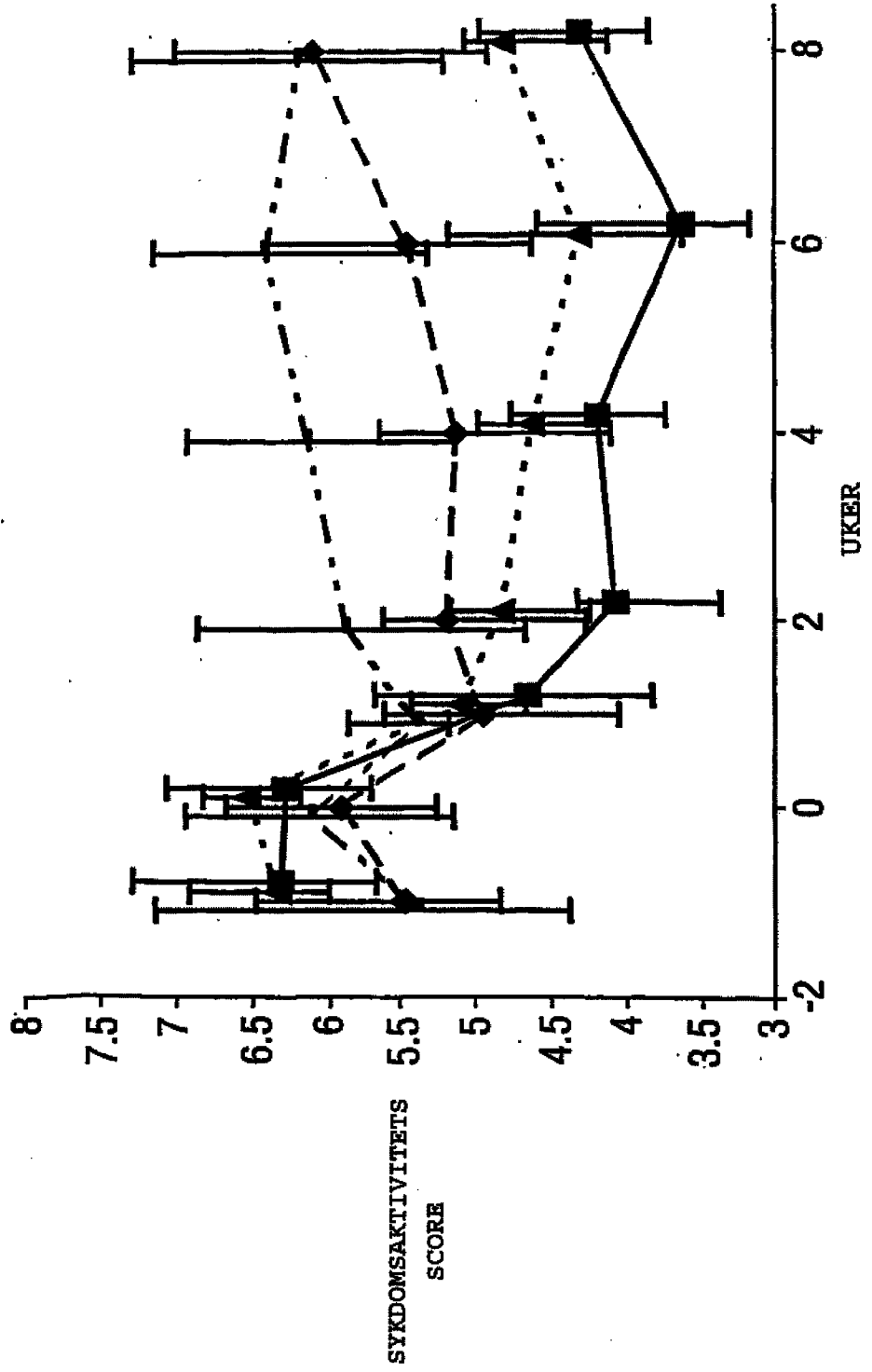
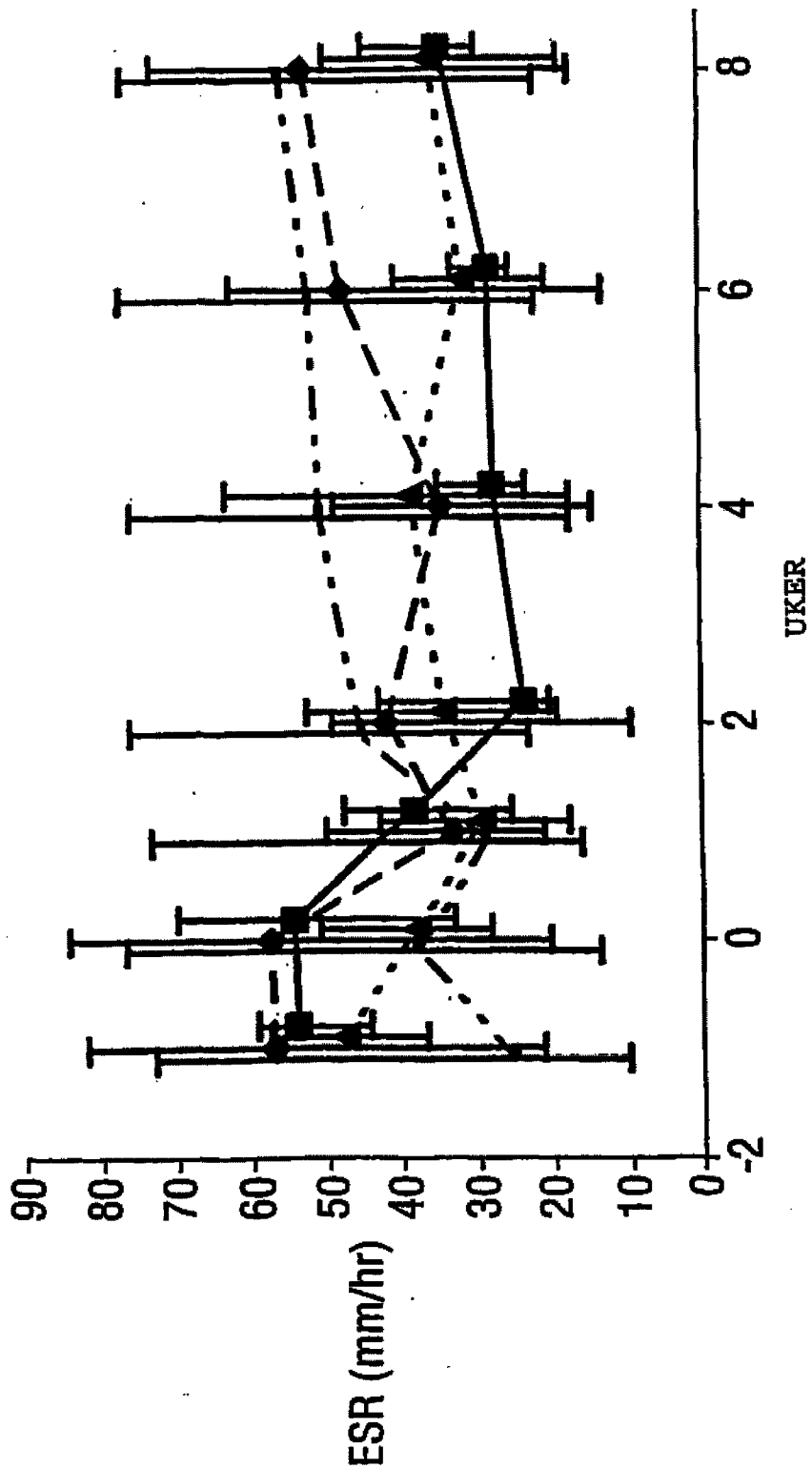
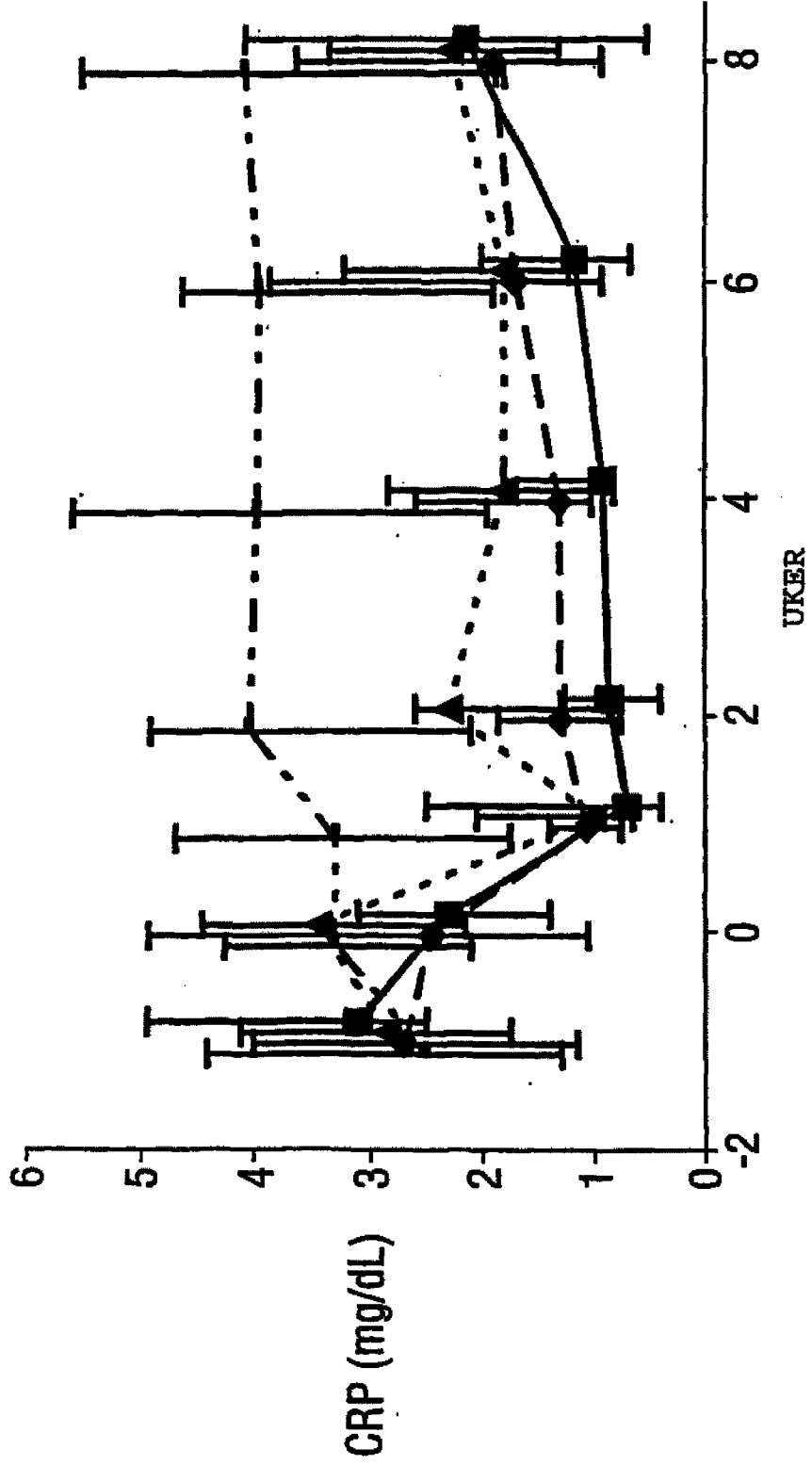


FIG. 24



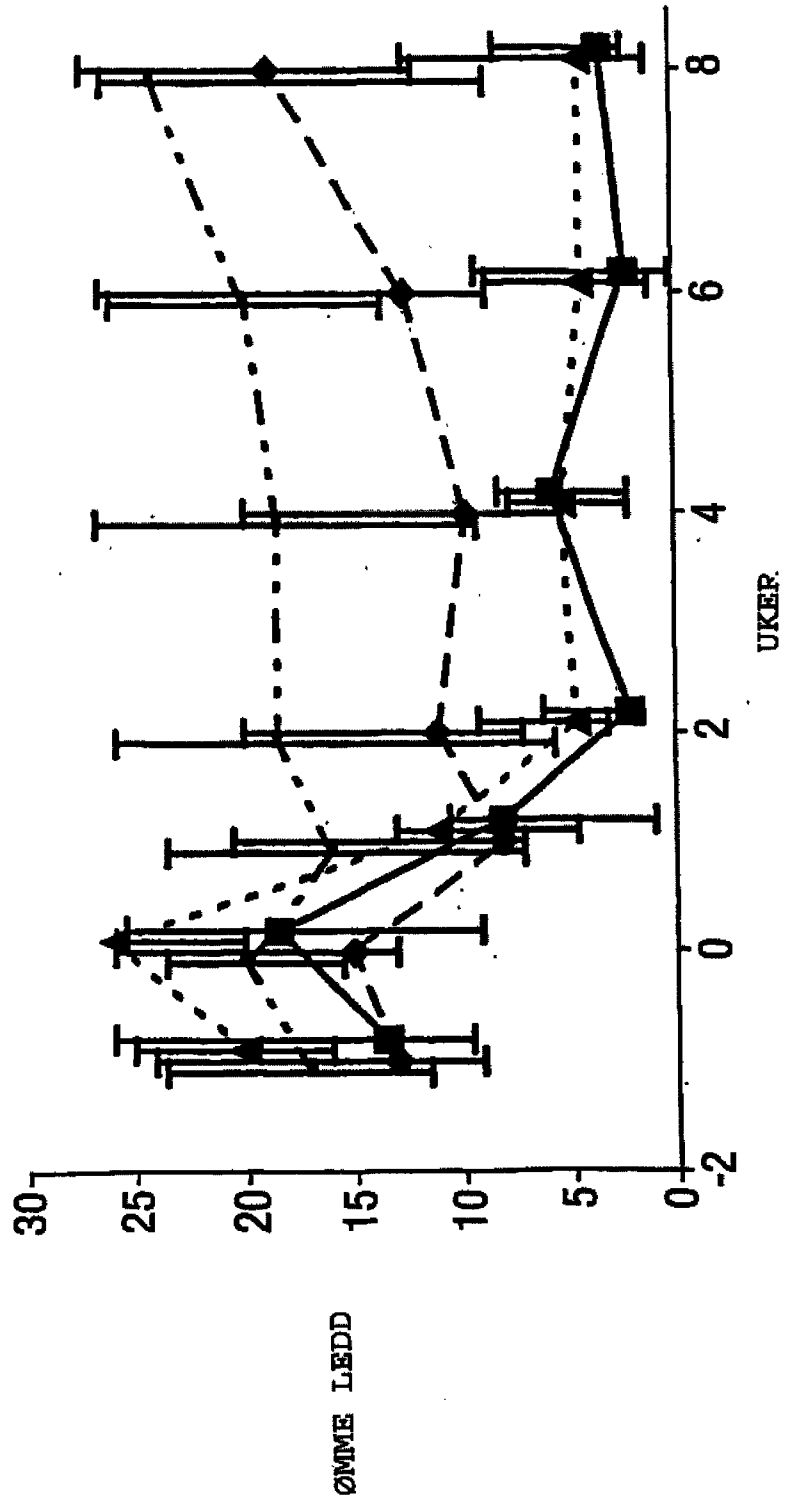
21/27

FIG. 24(forts.)



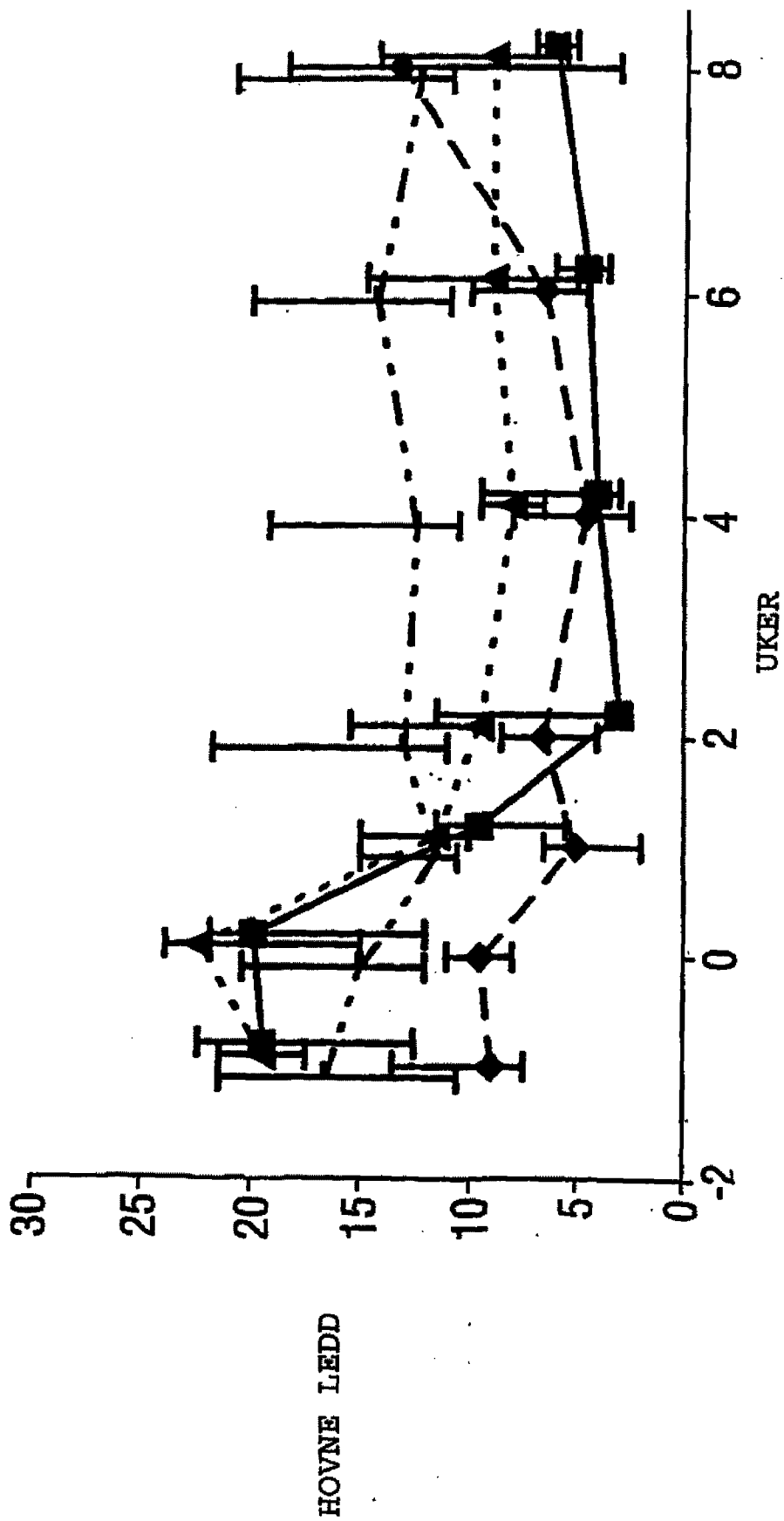
22/27

FIG. 24(forts.)



23/27

FIG. 24(forts.)

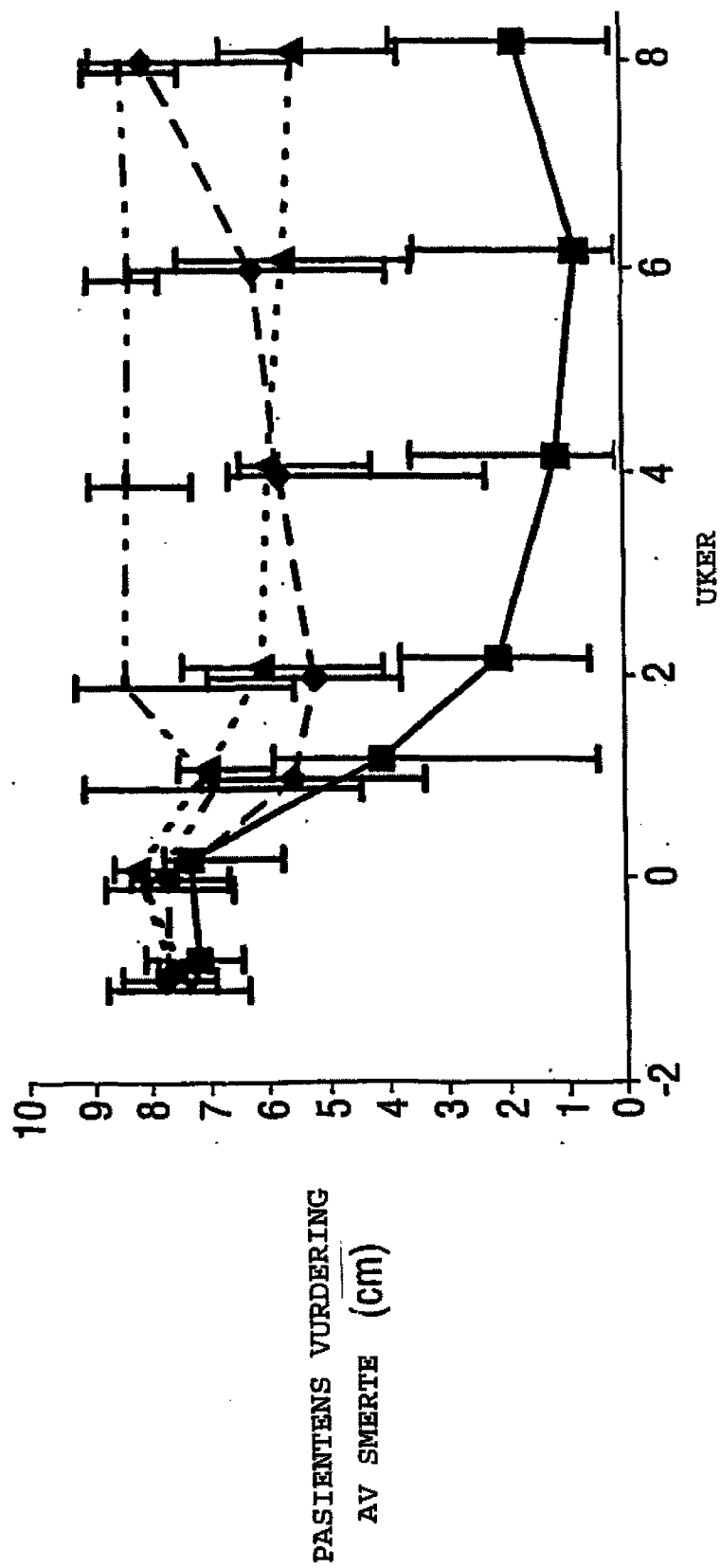


HOVNE LEDD

UKER

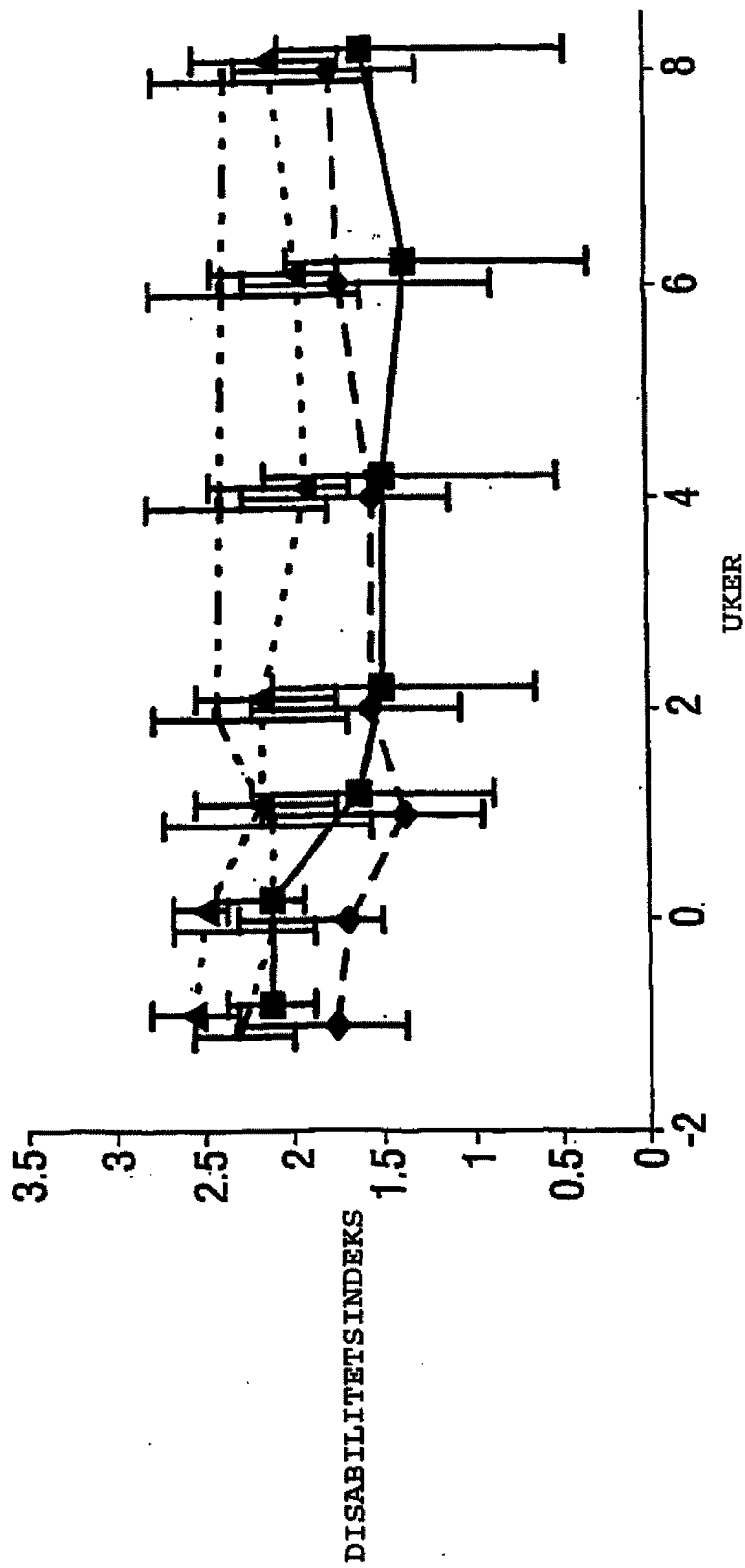
24/27

FIG. 24(forts.)



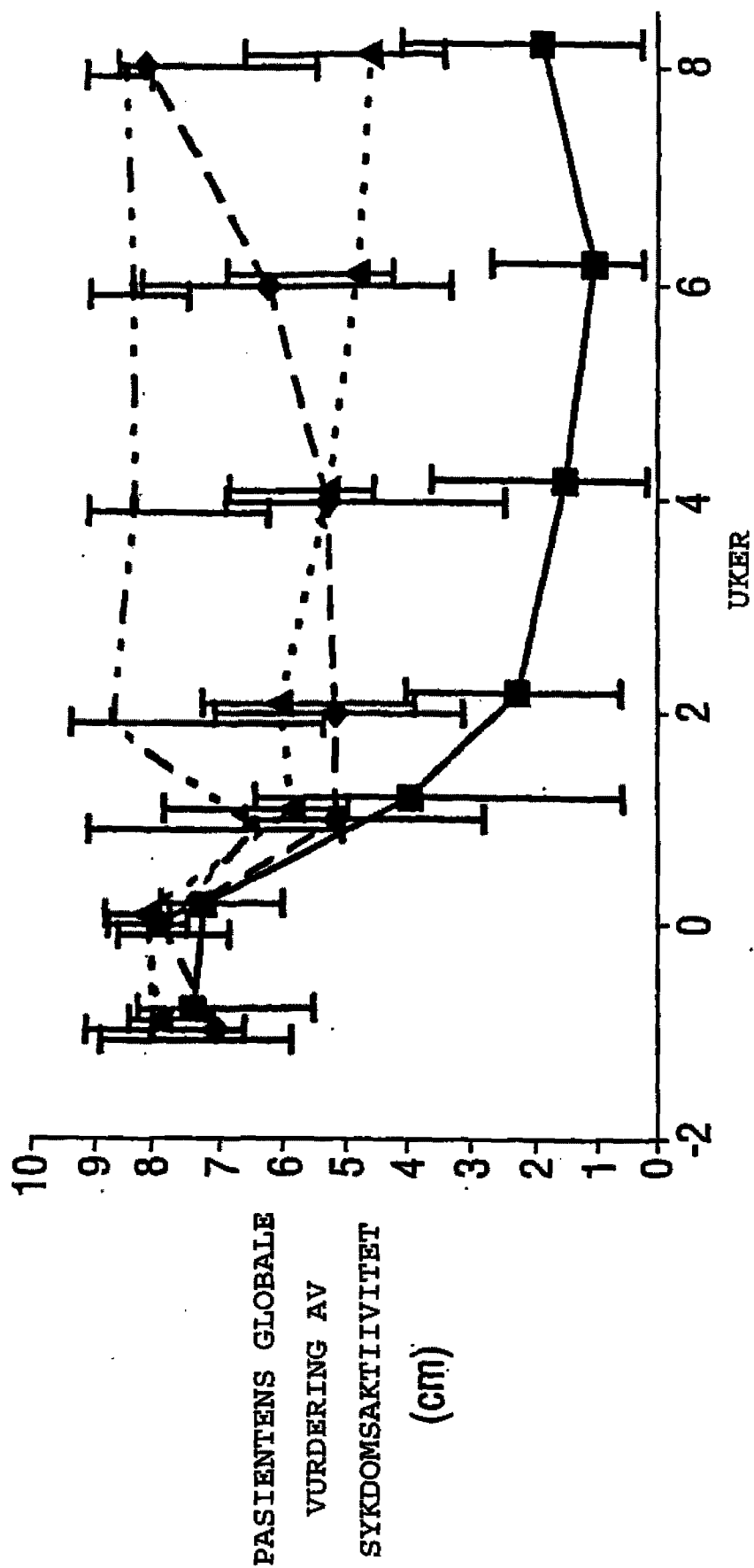
25/27

FIG. 24(forts.)



26/27

FIG. 24(forts.)



27127

FIG. 24(forts.)

