



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 17/08** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002105922/13, 05.06.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.06.2001

(30) Конвенционный приоритет:  
06.06.2000 GB 0013810.7

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2003

(45) Опубликовано: 27.07.2007 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 9825971 A, 18.06.1998. WO 9964460  
A, 16.12.1990. WO 9211383 A, 09.07.1992. RU  
2139092 C1, 10.10.1999.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
06.03.2002

(86) Заявка РСТ:  
GB 01/02477 (05.06.2001)

(87) Публикация РСТ:  
WO 01/94585 (13.12.2001)

Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ЭТВАЛ Дилджит Сингх (GB),  
БРАУН Дерек Томас (GB),  
ВЭЙР Эндрю Нэйл Чарльз (GB),  
ПОППЛВЕЛЛ Эндрю Джордж (GB),  
ЧЕПМЭН Эндрю Пол (GB),  
КИНГ Дэвид Джон (GB)

(73) Патентообладатель(и):

СЕЛЛТЕК Р ЭНД Д ЛИМИТЕД (GB)

## (54) МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ, ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА АЛЬФА ОПУХОЛИ ЧЕЛОВЕКА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. В изобретении описывается мышинное антитело и его гуманизированный вариант (CDP870), специфичные к фактору некроза опухоли альфа человека. Аминокислотная последовательность представлена в описании. Описаны также соединения с аффинностью в отношении фактора некроза опухоли альфа человека на основе гуманизованного антитела, у которых к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи присоединена лизилмалеимидная группа, ковалентно связанная по лизильному остатку с одной или несколькими молекулами метоксиполи(этиленгликоля). Раскрыты последовательности ДНК, кодирующих антитела, специфичные к фактору некроза опухоли альфа

человека, и варианты векторов экспрессии, содержащие указанные ДНК. Описаны варианты способа получения клетки-хозяина с использованием векторов экспрессии и варианты способа получения антител на основе полученных клеток-хозяев. Раскрыты терапевтические композиции для лечения патологии, опосредованной фактором некроза опухоли альфа, на основе антител. Изобретение обеспечивает антитела с высокой аффинностью: для мышинного антитела  $0,85 \times 10^{-10}$  М, для его гуманизованного варианта  $0,5 \times 10^{-10}$  М, и низкой иммуногенностью у человека - для гуманизованного антитела. Доля пациентов с улучшенным ACR20 составила при введении 5 и 20 мг/кг CDP870 соответственно 75% и 75% через 8 недель. Полупериод существования в плазме CDP870 составил 14 дней. 21 н. и 37 з.п.

RU 2303604 C2

RU 2303604 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C07K 16/24* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 17/08* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2002105922/13, 05.06.2001**(24) Effective date for property rights: **05.06.2001**(30) Priority:  
**06.06.2000 GB 0013810.7**(43) Application published: **27.09.2003**(45) Date of publication: **27.07.2007 Bull. 21**(85) Commencement of national phase: **06.03.2002**(86) PCT application:  
**GB 01/02477 (05.06.2001)**(87) PCT publication:  
**WO 01/94585 (13.12.2001)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**EhTVAL Dildzhit Singkh (GB),  
BRAUN Derek Tomas (GB),  
VEhJR Ehndrju Nejl Charl'z (GB),  
POPPLVELL Ehndrju Dzhordzh (GB),  
ChEPMEhN Ehndrju Pol (GB),  
KING Dehvid Dzhon (GB)**

(73) Proprietor(s):

**SELLTEK R EhND D LIMITED (GB)**

(54) **ANTIBODY MOLECULES POSSESSING SPECIFICITY WITH RESPECT TO HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA AND THEIR USING**

(57) Abstract:

FIELD: immunology, biotechnology.

SUBSTANCE: invention describes murine antibody and its humanized variant (CDP870) showing specificity to human tumor necrosis factor-alpha. Amino acid sequence is given in the description. Also, invention describes compounds showing affinity with respect to human tumor necrosis factor-alpha based on humanized antibody wherein lysylmaleimide group bound covalently with one or some methoxypoly(ethylene glycol) molecules by lysyl residue is joined to one of cysteine residues by C-end of heavy chain of the humanized antibody. Invention discloses DNA sequences encoding antibodies showing specificity to human tumor necrosis factor-alpha and variants if expression vectors involving indicated DNAs. Also, invention describes variants of a method

for preparing a host-cell using expression vectors and variants of a method for preparing antibodies based on prepared host-cells. Invention discloses therapeutic compositions used in treatment of pathology mediated by tumor necrosis factor-alpha based on antibodies. Invention provides providing antibodies showing high affinity:  $0.85 \times 10^{-10}$  M for murine antibodies and  $0.5 \times 10^{-10}$  M for its humanized variant and low immunogenicity for human for humanized antibodies. Part of patients with improved ACR20 in administration of 5 and 20 mg/kg of CDP870 is 75% and 75% in 8 weeks, respectively. Half-life value of CDP870 in plasma is 14 days.

EFFECT: valuable biological and medicinal properties of antibodies.

58 cl, 24 dwg, 6 tbl, 1 ex

Данное изобретение относится к молекуле антитела, имеющей специфичность в отношении антигенных детерминант фактора некроза альфа опухоли человека (TNF $\alpha$ ). Данное изобретение относится также к терапевтическим применениям данной молекулы антитела и способам получения данной молекулы антитела.

5 Данное изобретение относится к молекулам антител. В молекуле антитела имеются две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь и каждая легкая цепь имеет на ее N-концевой стороне переменный домен. Каждый переменный домен состоит из  
10 четырех каркасных районов (FR), перемежающихся с тремя определяющими комплементарность (гиперпеременными) районами (CDR). Остатки в переменных доменах обычно нумеруются в соответствии с системой, изобретенной Kabat et al. Эта система приведена в Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее называемой «Kabat et al. (supra)»). Эта система нумерации используется в данном описании, за исключением случаев, где дается иное указание.

15 Обозначение остатков по Kabat не всегда прямо соответствует линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная последовательность аминокислот может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты по сравнению со строгой нумерацией по Kabat в соответствии с укорочением структурного элемента или вставкой в структурный компонент либо каркасной области, либо CDR, базовой структуры  
20 переменного домена. Точная нумерация остатков по Kabat может быть определена для конкретного антитела сопоставлением гомологичных остатков в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью.

CDR переменного домена тяжелой цепи расположены при остатках 31-35 (CDRH1), остатках 50-65 (CDRH2) и остатках 95-102 (CDRH3) в соответствии с нумерацией по Kabat.

25 CDR переменного домена легкой цепи расположены при остатках 24-34 (CDRL1), остатках 50-56 (CDRL2) и остатках 89-97 (CDRL3) в соответствии с нумерацией по Kabat.

Конструкция CDR-привитых антител описана в Европейской заявке на патент EP-A-0239400, раскрывающей способ, в котором CDR мышинового моноклонального антитела пересаживают на каркасные области переменных доменов иммуноглобулина человека  
30 посредством сайт-направленного мутагенеза с использованием длинных олигонуклеотидов. CDR определяют антигенсвязывающую специфичность антител и являются относительно короткими пептидными последовательностями, несомыми каркасными областями переменных доменов.

Самая ранняя работа по гуманизации моноклональных антител CDR-пересадкой  
35 проводилась на моноклональных антителах, узнающих синтетические антигены, такие как NP. Однако примеры, в которых мышинное моноклональное антитело, узнающее лизоцим, и крысиное моноклональное антитело, узнающее антиген на Т-клетках человека, были гуманизированы CDR-пересадкой, были описаны Verhoeven et al. (Science, 239, 1534-1536, 1988) и Riechmann et al. (Nature, 332, 323-324, 1988) соответственно.

40 Riechmann et al. нашли, что перенос только CDR (определенного Kabat (Kabat et al. (supra) и Wu et al., J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) был недостаточным для обеспечения удовлетворительной антигенсвязывающей активности в CDR-привитом продукте. Было обнаружено, что ряд каркасных остатков должны быть изменены таким образом, чтобы они соответствовали остаткам донорской каркасной области.

45 Предлагаемые критерии для выбора, какие каркасные остатки необходимо изменить, описаны в Международной заявке на патент WO 90/07861.

Был опубликован ряд обзоров, обсуждающих CDR-привитые антитела, в том числе Vaughan et al. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

50 TNF $\alpha$  представляет собой провоспалительный цитокин, который высвобождается клетками иммунной системы и взаимодействует с клетками иммунной системы. Так, TNF $\alpha$  высвобождается макрофагами, которые были активированы липополисахаридами (ЛПС) грамотрицательных бактерий. Как таковой TNF $\alpha$  является, по-видимому, эндогенным медиатором центральной важности, участвующим в развитии и патогенезе

эндотоксического шока, связанного с бактериальным сепсисом. Было показано, что  $TNF_{\alpha}$  положительно регулируется при ряде заболеваний человека, в том числе хронических заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит и множественный склероз. Мыши, трансгенные в отношении  $TNF_{\alpha}$  человека, продуцируют высокие уровни  $TNF_{\alpha}$  конститутивно и развивают спонтанный деструктивный полиартрит, напоминающий ревматоидный артрит (Kaffer et al., EMBO J., 10, 4025-4031, 1991). Таким образом,  $TNF_{\alpha}$  называют провоспалительным цитокином.

Моноклональные антитела против  $TNF_{\alpha}$  известны из предшествующего уровня техники. Meager et al. (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) описывают мышинные моноклональные антитела против рекомбинантного  $TNF_{\alpha}$ . Fendly et al. (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) описывают применение мышинных моноклональных антител против рекомбинантного  $TNF_{\alpha}$  для определения нейтрализующих эпитопов на TNF. Shimamoto et al. (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) описывают применение мышинных моноклональных антител против  $TNF_{\gamma}$  и их применение для предупреждения эндотоксического шока у мышей. Кроме того, в Международной заявке на патент WO 92/11383 описаны антитела, в том числе CDR-привитые антитела, специфические для  $TNF_{\alpha}$ . Rankin et al. (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) описывают применение таких CDR-привитых антител для лечения ревматоидного артрита. В US-A-5919452 описаны химерные антитела против TNF и их применение для лечения патологий, связанных с присутствием TNF.

Антитела к  $TNF_{\alpha}$  были предложены для профилактики и лечения эндотоксинового бактериально-токсического шока (эндотоксического шока) (Beutler et al., Science, 234, 470-474, 1985). Boomer et al. (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) и Wherry et al., (Critical Care Medicine, 21, S436-S440) обсуждают терапевтический потенциал антител против  $TNF_{\alpha}$  для лечения септического шока. Применение антител против  $TNF_{\alpha}$  для лечения септического шока обсуждается также Kirschenbaum et al. (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). Индуцируемый коллагеном артрит может эффективно лечиться с использованием моноклонального антитела против  $TNF_{\alpha}$  (Williams et al. (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

Увеличенные уровни  $TNF_{\alpha}$  обнаруживают как в синовиальной жидкости, так и в периферической крови пациентов, страдающих от ревматоидного артрита. При введении  $TNF_{\alpha}$ -блокирующих агентов пациентам, страдающим от ревматоидного артрита, у них уменьшается воспаление, улучшаются симптомы и замедляется повреждение суставов (McKown et al. (Arthritis Rheum., 42, 1204-1208, 1999).

Применение антител против  $TNF_{\alpha}$  для лечения ревматоидного артрита и болезни Крона обсуждается в Feldman et al. (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al. (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) и в Feldman et al. (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Антитела к  $TNF_{\alpha}$ , используемые в таких способах лечения, обычно являются химерными антителами, такими как описано в US-A-5919452.

Два  $TNF_{\alpha}$ -блокирующих продукта лицензированы в настоящее время для лечения ревматоидного артрита. Первый, названный этанерцептом, продается Immunex Corporation в виде Enbrel<sup>TM</sup>. Он представляет собой рекомбинантный слитый белок, содержащий два р75 растворимых TNF-рецепторных домена, связанных с Fc-частью иммуноглобулина человека. Второй, названный инфликсимабом, продается Centocor Corporation в виде Remicade<sup>TM</sup>. Он представляет собой химерное антитело, имеющее мышинные переменные домены анти- $TNF_{\alpha}$  и константные домены IgG1 человека.

Молекулы рекомбинантного антитела к  $TNF_{\alpha}$  предшествующего уровня техники обычно имеют пониженную аффинность в отношении  $TNF_{\alpha}$  по сравнению с антителами, из которых получены переменные районы или CDR, и обычно должны продуцироваться в клетках млекопитающих и их производство является дорогостоящим. Антитела к  $TNF_{\alpha}$  предшествующего уровня техники описаны в Stephens et al. (Immunology, 85, 668-674,

1995), GB-A-2246570 и GB-A-2297145.

Существует потребность в молекуле антитела для лечения хронических воспалительных заболеваний, которая может быть использована повторно и может быть легко и эффективно получена. Существует также потребность в молекуле антитела, которая имеет

5

высокую аффинность в отношении  $TNF\alpha$  и низкую иммуногенность у человека. В первом аспекте данное изобретение обеспечивает молекулу антитела, имеющую специфичность в отношении  $TNF\alpha$ , содержащую тяжелую цепь, в которой вариабельный домен содержит CDR (как определено Kabat et al. (supra)), имеющий последовательность, приведенную в виде H1 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 1) для CDRH1, в виде H2' на фигуре 3

10

(SEQ ID NO: 2) или в виде H2 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 7) для CDRH2 или в виде H3 на фигуре 3 (SEQ ID NO:3) для CDRH3. Молекула антитела первого аспекта данного изобретения содержит по меньшей мере один CDR, выбранный из H1, H2' или H2 и H3 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 3) для вариабельного домена тяжелой цепи. Предпочтительно данная

15

молекула антитела содержит по меньшей мере два и более, предпочтительно все три, CDR в вариабельном домене тяжелой цепи. Во втором аспекте данного изобретения обеспечена молекула антитела, имеющая специфичность в отношении  $TNF\alpha$  человека, содержащая легкую цепь, в которой вариабельный домен содержит CDR (как определено Kabat et al. (supra)), имеющий

20

последовательность, представленную в виде L1 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 4) для CDRL1, L2 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 5) для CDRL2 или L3 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 6) для CDRL3. Молекула антитела второго аспекта данного изобретения содержит по меньшей мере один CDR, выбранный из L1, L2 и L3 (SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 6) для вариабельного домена легкой цепи. Предпочтительно данная молекула антитела содержит по меньшей

25

мере два или более, предпочтительно все три, CDR в вариабельном домене легкой цепи. Молекулы антител первого и второго аспектов данного изобретения предпочтительно имеют комплементарную легкую цепь или комплементарную тяжелую цепь соответственно.

Предпочтительно молекула антитела первого или второго аспектов данного изобретения содержит тяжелую цепь, в которой вариабельный домен содержит CDR (как определено Kabat et al. (supra)), имеющий последовательность, представленную в виде H1 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 1) для CDRH1, в виде H2' или H2 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7) для CDRH2 или в виде H3 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 3) для CDRH3, и легкую цепь, в которой вариабельный домен содержит CDR (как определено Kabat et al. (supra)), имеющий последовательность, представленную в виде L1 на фигуре 3 (SEQ ID NO:4) для

30

35

CDRL1, в виде L2 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 5) для CDRL2 или в виде L3 на фигуре 3 (SEQ ID NO: 6) для CDRL3. CDR, представленные в SEQ ID NO: 1 и 3-7 на фигуре 3, цитированные выше, получены из мышиного моноклонального антитела hTNF40. Однако SEQ ID NO: 2 состоит из гибридного CDR. Этот гибридный CDR содержит часть CDR2 тяжелой цепи из мышиного

40

моноклонального антитела hTNF40 (SEQ ID NO: 7) и часть CDR2 тяжелой цепи из последовательности V-области зародышевой линии группы 3 человека. Полные последовательности вариабельных доменов мышиного антитела hTNF40 показаны на фигуре 6 (легкая цепь) (SEQ ID NO: 99) и фигуре 7 (тяжелая цепь) (SEQ ID NO: 100). Это мышиное антитело называют ниже «донорским антителом».

45

Первым альтернативно предпочтительным вариантом первого или второго аспекта данного изобретения является мышиное моноклональное антитело hTNF40, имеющее последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепи, показанные на фигуре 6 (SEQ ID NO: 99) и фигуре 7 (SEQ ID NO: 100) соответственно. Константная область легкой цепи hTNF40 является каппа-цепью, а константная область тяжелой цепи является

50

IgG2a. Во втором альтернативно предпочтительном варианте антитело в соответствии либо с первым, либо со вторым аспектами данного изобретения является химерной молекулой мышь/человек, называемой здесь химерной молекулой антитела hTNF40. Химерная

молекула антитела содержит переменные домены мышиногo моноклонального антитела hTNF40 (SEQ ID NO: 99 и 100) и константные домены человека. Предпочтительно молекула химерного антитела hTNF40 содержит C-каппа-домен человека (Hieter et al., Cell, 22, 197-207, 1980; номер доступа Genbank J00241) в легкой цепи и 4 гамма-домена человека (Flanagan et al., Nature, 300, 709-713, 1982) в тяжелой цепи.

В третьем альтернативно предпочтительном варианте антитело в соответствии с первым и вторым аспектами данного изобретения является CDR-привитой молекулой антитела (молекулой антитела с пересаженным CDR). Термин «CDR-привитая молекула антитела» в применении здесь относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит один или несколько CDR (в том числе, если желательно, гибридный CDR) из донорского антитела (например, мышиногo моноклонального антитела), пересаженный в каркас переменной области тяжелой или легкой цепи акцепторного антитела (например, антитела человека).

Предпочтительно такое CDR-привитое антитело имеет переменный домен, содержащий акцепторные каркасные районы человека, а также один или несколько донорских CDR, указанных выше.

При пересадке CDR может быть использована любая каркасная последовательность переменного района подходящего акцептора с учетом класса/типа донорского антитела, из которого происходят данные CDR, в том числе каркасные районы мыши, приматов и человека. Примерами каркасов человека, которые могут быть использованы в данном изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al. (supra)). Например, KOL и NEWM могут быть использованы для тяжелой цепи, REI может быть использован для легкой цепи, а EU, LAY и POM могут быть использованы как для тяжелой, так и для легкой цепи. Предпочтительными каркасными областями для легкой цепи являются каркасные области группы 1 человека, показанные на фигуре 1 (SEQ ID NO: 83, 85, 87 и 89). Предпочтительными каркасными областями для тяжелой цепи являются каркасные области группы 1 и группы 3 человека, показанные на фигуре 2 (SEQ ID NO: 91, 93, 95 и 97 и SEQ ID NO: 106, 107, 108 и 109) соответственно.

В CDR-привитом антителе данного изобретения предпочтительно использовать в качестве акцепторного антитела такое антитело, которое имеет цепи, гомологичные цепям донорского антитела. Акцепторные тяжелая и легкая цепи не должны быть обязательно получены из одного и того же антитела и могут, если желательно, содержать композиционные (составные) цепи, имеющие каркасные области, происходящие из различных цепей.

В CDR-привитом антителе данного изобретения каркасные области не должны обязательно иметь ту же самую последовательность, которую имеет акцепторное антитело. Например, необычные остатки могут быть изменены на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть изменены таким образом, что они соответствуют остаткам, обнаруживаемым в том же самом положении в донорском антителе. Такие изменения должны поддерживаться до минимума, необходимого для восстановления аффинности донорского антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые должны быть изменены, представлен в WO 91/09967.

Предпочтительно в молекуле CDR-привитого антитела данного изобретения, если акцепторная тяжелая цепь имеет каркасные области группы 1 человека (показанные на фигуре 2) (SEQ ID NO: 91, 93, 95 и 97), то данные акцепторные каркасные области тяжелой цепи содержат, кроме одного или нескольких донорских CDR, донорские остатки в положениях 28, 69 и 71 (в соответствии с Kabat et al. (supra)).

Альтернативно, если акцепторная тяжелая цепь имеет каркасные области группы 1, то данные акцепторные каркасные области тяжелой цепи содержат, кроме одного или нескольких донорских CDR, донорские остатки в положениях 28, 38, 46, 67, 69 и 71 (в соответствии с Kabat et al. (supra)).

Предпочтительно в молекуле CDR-привитого антитела данного изобретения, если акцепторная тяжелая цепь имеет каркасные области группы 3 человека (показанные на фигуре 2) (SEQ ID NO: 106, 107, 108 и 109), то данные акцепторные каркасные области тяжелой цепи содержат, кроме одного или нескольких донорских CDR, донорские остатки в

5 положениях 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 и 78 (в соответствии с Kabat et al. (supra)).

Предпочтительно в молекуле CDR-привитого антитела данного изобретения, если акцепторная легкая цепь имеет каркасные области группы 1 человека (показанные на фигуре 1) (SEQ ID NO: 83, 85, 87 и 89), то данные акцепторные каркасные области легкой цепи содержат донорские остатки в положениях 46 и 60 (в соответствии с Kabat

10 et al., (supra)).

Донорские остатки являются остатками из донорского антитела, т.е. антитела, из которого первоначально происходят CDR.

Молекула антитела данного изобретения может содержать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелую и легкую цепи; его фрагмент, такой как Fab,

15 модифицированный Fab, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- или Fv-фрагмент; мономер или димер легкой цепи или тяжелой цепи; одноцепочечное антитело, например одноцепочечный Fv, в котором переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены пептидным линкером. Подобным образом, переменные домены тяжелой и легкой цепей могут быть скомбинированы с доменами другого антитела, если необходимо.

20 Предпочтительно молекула антитела данного изобретения является Fab-фрагментом.

Предпочтительно Fab-фрагмент имеет тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 111, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 113. Аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113, предпочтительно кодируются

25 нуклеотидными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: 112 соответственно.

Альтернативно, предпочтительно, чтобы молекула антитела данного изобретения была модифицированным Fab-фрагментом, в котором данная модификация является

30 добавлением к С-концевой стороне его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для создания возможности присоединения эффекторной или репортерной молекулы.

Предпочтительно дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или два остатка цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная или репортерная молекула. Такой модифицированный Fab-фрагмент предпочтительно имеет тяжелую цепь, имеющую последовательность,

35 приведенную в виде SEQ ID NO: 115, и легкую цепь, имеющую последовательность, приведенную в виде SEQ ID NO: 113. Аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 115, предпочтительно кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 114.

Предпочтительной эффекторной группой является полимерная молекула, которая

40 может быть присоединена к модифицированному Fab-фрагменту для увеличения его биологического полупериода существования *in vivo*.

Данная полимерная молекула может обычно быть синтетическим или природно встречающимся полимером, например необязательно замещенным имеющим прямую или разветвленную цепь полиалкиленовым, полиалкениленовым или полиоксиалкиленовым

45 полимером, или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают в себя одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп. Конкретные примеры синтетических полимеров включают в себя

50 необязательно замещенные, имеющие прямую или разветвленную цепь поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или их производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные. Конкретные природно встречающиеся



полимеры включают в себя лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные. «Производные» в применении здесь включают в себя реакционноспособные производные, например тиол-селективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды, и т.п. Реакционноспособная группа может быть связана непосредственно или через линкерный сегмент с данным полимером. Должно быть понятно, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связывающей группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера может варьироваться, если желательно, но обычно будет находиться в диапазоне средней молекулярной массы от 500 Да до 50000 Да, предпочтительно от 5000 до 40000 Да и более предпочтительно от 25000 до 40000 Да. Размер полимера может быть, в частности, выбран на основании предполагаемого применения данного продукта. Так, например, если продукт должен покидать кровоток и проникать в ткань, например, для использования для лечения опухоли, может быть выгодным применение полимера с небольшой молекулярной массой, например с молекулярной массой около 5000 Да. Для применений, в которых этот продукт остается в кровотоке, может быть выгодным применение полимера с более высокой молекулярной массой, например имеющего молекулярную массу в диапазоне от 25000 Да до 40000 Да.

Особенно предпочтительные полимеры включают в себя полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль), или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 25000 Да до приблизительно 40000 Да.

Каждая полимерная молекула, присоединенная к фрагменту модифицированного антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, локализованного в данном фрагменте. Ковалентная связь будет обычно дисульфидной связью или, в частности, сера-углеродной связью.

Если желательно, фрагмент антитела может иметь присоединенные к нему эффекторные или репортерные молекулы. Эффекторные или репортерные молекулы могут быть присоединены к фрагменту антитела через любую доступную функциональную группу боковой цепи аминокислоты или терминальной аминокислоты, расположенной в данном фрагменте, например через любую свободную амина, имино, гидроксильную или карбоксильную группу.

Активированный полимер может быть использован в качестве исходного материала в приготовлении модифицированных полимером фрагментов антител, описанных выше. Активированный полимер может быть любым полимером, содержащим тиол-реактивную группу, такую как  $\alpha$ -галогенкарбоновая кислота или эфир, например иодацетамид, имид, например малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы могут быть получены коммерчески (например, из Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов при помощи общепринятых химических процедур.

Что касается присоединения поли(этиленгликоля) (ПЭГ-частей), делается ссылка на «Poly (ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications», 1992, J. Milton Harris (ed.). Plenum Press, New York, «Poly (ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications», 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington DC and «Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences», 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

Если желательно получение фрагмента антитела, связанного с эффекторной или репортерной молекулой, он может быть получен стандартными химическими процедурами или процедурами рекомбинантных ДНК, в которых фрагмент антитела связывают либо непосредственно, либо через связывающий агент с эффекторной или репортерной молекулой либо до, либо после реакции с активированным полимером, по необходимости. Конкретные химические процедуры включают в себя, например, процедуры, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 и WO 89/01476. Альтернативно, если

эффекторная или репортерная молекула является белком или полипептидом, эта связь может быть достигнута с использованием процедур рекомбинантных ДНК, например, описанных в WO 86/01533 и EP-A-0392745.

Предпочтительно модифицированный Fab-фрагмент данного изобретения является ПЭГилированным (т.е. имеет ковалентно присоединенный к нему ПЭГ (поли(этиленгликоль)) в соответствии со способом, описанным в EP-A-0948544. Предпочтительно молекула антитела данного изобретения является ПЭГилированным модифицированным Fab-фрагментом, как показано на фигуре 13. Как показано на фигуре 13, модифицированный Fab-фрагмент имеет малеимидную группу, ковалентно связанную с единственной тиоловой группой в модифицированной шарнирной области. Остаток лизина ковалентно связан с данной малеимидной группой. К каждой аминокислоте на остатке лизина присоединен полимер метоксиполи(этиленгликоль), имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Общая молекулярная масса всей эффекторной молекулы равна, следовательно, приблизительно 40000 Да.

Предпочтительно в соединении, показанном на фигуре 13, тяжелая цепь относящейся к антителу части имеет последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 115, а легкая цепь имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113. Данное соединение называется как CDP870.

Домены константной области молекулы антитела данного изобретения, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут требоваться. Например, домены константной области могут быть доменами IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В частности, могут быть использованы домены константной области IgG человека, в частности изоформ IgG1 и IgG3, когда данная молекула антитела предназначена для терапевтических применений и требуются эффекторные функции антитела. Альтернативно, могут быть использованы изоформы IgG2 и IgG4, когда данная молекула антитела предназначена для терапевтических целей и не требуются эффекторные функции антитела, например, просто для блокирования TNF $\alpha$ -активности.

Молекула антитела данного изобретения может также иметь присоединенную к ней эффекторную или репортерную молекулу. Например, она может иметь макроцикл для хелатирования атома тяжелого металла, или токсин, такой как ризин, присоединенные к ней ковалентной мостиковой структурой. Альтернативно, могут быть использованы процедуры технологии рекомбинантных ДНК для получения молекулы антитела, в котором Fc-фрагмент (CH2, CH3 и шарнирные домены), домены CH2 и CH3 или домен CH3 полной молекулы иммуноглобулина были заменены функциональным неиммуноглобулиновым белком или имеют присоединенный к ним пептидной связью функциональный неиммуноглобулиновый белок, такой как молекула фермента или токсина.

Молекула антитела данного изобретения предпочтительно имеет связывающую аффинность по меньшей мере  $0,85 \times 10^{-10}$  М, более предпочтительно по меньшей мере  $0,75 \times 10^{-10}$  М и наиболее предпочтительно по меньшей мере  $0,5 \times 10^{-10}$  М. (Стоит отметить, что предпочтительная гуманизованная молекула антитела данного изобретения, описанная ниже, имеет аффинность около  $0,5 \times 10^{-10}$  М, что превышает аффинность мышинового моноклонального антитела, из которого она получена. Мышиное антитело имеет аффинность около  $0,85 \times 10^{-10}$  М.)

Предпочтительно молекула антитела данного изобретения содержит переменный домен легкой цепи hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) и переменный домен тяжелой цепи gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11). Последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей показаны на фигурах 8 и 11 соответственно.

Данное изобретение относится также к вариантам молекулы антитела данного изобретения, которые имеют улучшенную аффинность в отношении TNF $\alpha$ . Такие варианты могут быть получены посредством ряда протоколов достижения аффинности, включающих в себя мутацию CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), применение

штаммов-мутаторов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724-733, 1997), фаговое представление (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и связанную с полом ПЦР (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (*supra*) обсуждает

5 эти способы достижения аффинности.

Данное изобретение обеспечивает также последовательность ДНК, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь молекулы антитела данного изобретения.

Предпочтительно данная последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела данного изобретения.

10 В одном предпочтительном варианте данная последовательность ДНК кодирует легкую цепь и содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8 (hTNF40-gL1) или SEQ ID NO: 9 (hTNF40-gL2), или ее вырожденный эквивалент.

В альтернативном предпочтительном варианте данная последовательность ДНК кодирует тяжелую цепь и содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:10  
15 (gh1hTNF40.4) или SEQ ID NO: 11 (gh3hTNF40.4), или ее вырожденный эквивалент.

Последовательность ДНК данного изобретения может содержать синтетическую ДНК, например, полученную химической процедурой, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

20 Данное изобретение относится также к вектору для клонирования или экспрессии, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК данного изобретения.

Предпочтительно вектор для клонирования или экспрессии содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепь молекулы антитела данного изобретения соответственно.

В предпочтительном варианте данное изобретение обеспечивает экспрессирующий  
25 вектор *E.coli*, содержащий последовательность ДНК данного изобретения.

Предпочтительно этот экспрессирующий вектор представляет собой рТТО(CDP870), показанный схематически на фигуре 22.

Данное изобретение включает в себя также вектор рDNAEng-G1, показанный на фигуре  
19.

30 Общие способы, при помощи которых данные векторы могут быть сконструированы, способы трансфекции и способы культивирования являются хорошо известными специалистам в данной области. В этой связи делается ссылка на «Current Protocols in Molecular Biology», 1999, F.M.Ausubel (ed.), Wiley Interscience, New York and Maniatis Manual, выпускаемый Cold Spring Harbor Publishing.

35 Последовательности ДНК, которые кодируют молекулу антитела данного изобретения, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть тяжелой и легкой цепей или полные тяжелую и легкую цепи антитела, могут быть синтезированы, если желательно, из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных  
40 последовательностей.

ДНК, кодирующие акцепторные каркасные последовательности, являются широко доступными для специалистов в данной области и могут быть легко синтезированы на основе их известных аминокислотных последовательностей.

45 Стандартные способы молекулярной биологии могут быть использованы для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела данного изобретения. Желаемые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием способов синтеза олигонуклеотидов. Способы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть использованы при  
50 необходимости.

Любая подходящая система клетка-хозяин-вектор может быть использована для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела данного изобретения.

Бактериальные, например *E.coli*, или другие микробные системы могут быть

использованы отчасти для экспрессии фрагментов антител, таких как Fab и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты и, особенно Fv-фрагменты и одноцепочечные фрагменты антител, например, одноцепочечные Fv. Системы экспрессии эукариотических клеток-хозяев, например системы экспрессии клеток млекопитающих, могут быть использованы для

5 продуцирования более крупных молекул антител, в том числе полных молекул антител. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают в себя CHO, клетки миеломы или гибридомные клетки.

Данное изобретение обеспечивает также способ получения молекулы антитела данного изобретения, предусматривающий культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор

10 данного изобретения, в условиях, пригодных для проведения экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела данного изобретения, и выделение данной молекулы антитела.

Предпочтительно способ получения молекулы антитела данного изобретения предусматривает культивирование E.coli, содержащей экспрессирующий вектор,

15 содержащий последовательность ДНК данного изобретения, в условиях, пригодных для проведения экспрессии белка из данной последовательности ДНК, и выделение молекулы антитела. Молекула антитела может секретироваться из клетки или нацеливаться на периплазму посредством подходящих сигнальных последовательностей. Альтернативно данные молекулы антител могут накапливаться в цитоплазме клетки. Предпочтительно

20 молекула антитела нацелена на периплазму. В зависимости от продуцируемой молекулы антитела и используемого способа желателно давать молекулам антител повторно укладываться и принимать функциональную конформацию. Процедуры для создания возможности повторной укладки молекул антител хорошо известны специалистам в данной области.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, и в этом случае только кодирующая последовательность полипептида

25 тяжелой цепи или полипептида легкой цепи должна быть использована для трансфекции клетки-хозяина. Для получения продуктов, содержащих как тяжелую, так и легкую цепи, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, причем первый вектор

30 кодирует полипептид легкой цепи, а второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, может быть использован единственный вектор, причем данный вектор включает в себя последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Данное изобретение обеспечивает также терапевтическую или диагностическую

35 композицию, содержащую молекулу антитела данного изобретения в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем, разбавителем или носителем.

Данное изобретение обеспечивает также способ получения терапевтической или диагностической композиции, предусматривающий смешивание молекулы антитела

данного изобретения вместе с фармацевтически приемлемым наполнителем,

40 разбавителем или носителем.

Молекула антитела может быть единственным активным ингредиентом в терапевтической или диагностической композиции или может сопровождаться другими активными ингредиентами, в том числе ингредиентами антител, например антител против

45 T-клеток, против IFN $\gamma$  или против ЛПС, или не являющихся антителами ингредиентами, такими как ксантины.

Фармацевтические композиции должны предпочтительно содержать терапевтически эффективное количество антитела данного изобретения. Термин «терапевтически эффективное количество» в применении здесь обозначает количество терапевтического агента, необходимое для лечения, ослабления или предупреждения подлежащего лечению

50 заболевания или состояния или для проявления детектируемого терапевтического или превентивного эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективная доза может быть первоначально определена либо в тестах на культуре клеток, либо на моделях животных, обычно грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Модель животного

может быть также использована для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация может быть затем использована для определения применимых доз и способов для введения людям.

5 Точное эффективное количество для субъекта-человека будет зависеть от тяжести патологического состояния, общего здоровья субъекта, возраста, веса и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, комбинации (комбинаций) лекарственных средств, чувствительности реакции и переносимости/ответной реакции на терапию. Это количество может быть определено рутинным экспериментированием и находится в пределах способности суждения лечащего врача. Обычно эффективная доза будет от 0,01 мг/кг до 10 50 мг/кг, предпочтительно 0,1 мг/кг-20 мг/кг, более предпочтительно около 15 мг/кг. Как показано в примерах ниже, дозы 1, 5 и 20 мг/кг использовали для лечения пациентов, страдающих от ревматоидного артрита.

Композиции могут вводиться индивидуально пациенту или могут вводиться в комбинации с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами.

15 Доза, при которой вводят молекулу антитела данного изобретения, зависит от природы подлежащего лечению состояния, степени, в которой уровень подлежащего нейтрализации  $TNF_{\alpha}$  повышен, или ожидается, что он повышен, выше желаемого уровня, и от того, используется ли молекула антитела профилактически или для лечения существующего состояния.

20 Так, например, если продукт предназначен для лечения или профилактики хронического воспалительного заболевания, такого как ревматоидный артрит, подходящие дозы молекулы антитела данного изобретения лежат в диапазоне между 0,5 и 50 мг/кг, более предпочтительно между 1 и 20 мг/кг и наиболее предпочтительно около 15 мг/кг. Частота дозы будет зависеть от периода полувыведения молекулы антитела и продолжительности 25 ее действия.

Если молекула антитела имеет короткий период полувыведения (например, 2-10 часов), может быть необходимым предоставление только одной или нескольких доз в день. Альтернативно, если молекула антитела имеет продолжительный период полувыведения (например, 2-15 дней), может быть необходимым предоставлять дозу один раз в день, в 30 неделю или даже один раз каждые 1 или 2 месяца.

Фармацевтическая композиция может также содержать фармацевтически приемлемый носитель для введения данного антитела. Носитель сам не должен индуцировать продуцирование антител, вредных для индивидуума, принимающего данную композицию, и не должен быть токсичным. Подходящими носителями могут быть большие, медленно 35 метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Могут использоваться фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или 40 соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Дополнительно в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или pH-буферящие вещества. Такие 45 носители позволяют фармацевтическим композициям формироваться в таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, гели, сиропы, взвеси и суспензии для приема внутрь пациентом.

Предпочтительные формы для введения включают в себя формы, пригодные для парентерального введения, например инъекцией или инфузией, например болюсной инъекцией или непрерывной инфузией. Если продукт предназначен для инъекции или 50 инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и он может содержать формирующие агенты, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно молекула антитела может быть в сухой форме и восстанавливаться в требуемом виде

перед использованием с применением подходящей стерильной жидкости.

После приготовления композиции данного изобретения могут вводиться непосредственно субъекту. Подлежащими лечению субъектами могут быть животные. Однако предпочтительно, чтобы эти композиции были приспособлены для введения субъекту-человеку.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут вводиться любым из путей, в том числе, но не только, пероральным, внутривенным, внутримышечным, внутриартериальным, интрамезулярным, внутриоболочечным, внутрижелудочковым, трансдермальным, чрескожным (например, см. WO 98/20734), подкожным, внутривентральным, интраназальным, энтеральным, местным, сублингвальным, интравагинальным или ректальным путями. Гипоспреи могут быть также использованы для введения фармацевтических композиций данного изобретения. Обычно терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде инъекционных растворов, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Могут быть также приготовлены твердые формы, пригодные для растворения или для суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямая доставка композиций обычно выполняется инъекцией, подкожно, внутривентрально, внутривенно или внутримышечно, или композиции доставляются в интерстициальное пространство ткани. Композиции могут также вводиться в повреждение. Схема лечения может быть схемой применения одной дозы или схемой применения множественных доз.

Должно быть понятно, что активным ингредиентом в композиции будет молекула антитела. Как таковая, она будет чувствительной к деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композиция должна вводиться путем, использующим желудочно-кишечный тракт, данная композиция должна содержать агенты, которые защищают антитело от деградации, но которые высвобождают данное антитело, как только оно абсорбируется из желудочно-кишечного тракта.

Обстоятельное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Рассматривается также вопрос о том, что антитело данного изобретения будет вводиться с использованием генной терапии. Для достижения этой последовательности ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи молекулы антитела под контролем подходящих ДНК-компонентов, вводят пациенту таким образом, что цепи антитела экспрессируются из данных последовательностей ДНК и собираются *in situ*.

Данное изобретение обеспечивает также молекулу антитела данного изобретения для применения для лечения заболевания, опосредованного  $\text{TNF}\alpha$ .

Далее, данное изобретение обеспечивает применение молекулы антитела согласно данному изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания, опосредованного  $\text{TNF}\alpha$ .

Молекула антитела данного изобретения может быть также использована в любой терапии, где желательным является снижение уровня биологически активного  $\text{TNF}\alpha$ , присутствующего в теле человека или животного.  $\text{TNF}\alpha$  может циркулировать по телу или присутствовать при нежелательно высоком уровне в конкретном участке в теле.

Например, повышенные уровни  $\text{TNF}\alpha$  наблюдаются при острых и хронических иммунных и иммунорегуляторных нарушениях, инфекциях, включающих в себя септический, эндотоксиновый бактериально-токсический и сердечно-сосудистый шок, воспалительных нарушениях, нейродегенеративных заболеваниях, злокачественных заболеваниях и индуцированном алкоголем гепатите. Подробности многочисленных нарушений, связанных с повышенными уровнями  $\text{TNF}\alpha$ , изложены в патенте США US-A-5919452. Молекулы антитела данного изобретения могут быть использованы в терапии заболеваний, опосредуемых  $\text{TNF}\alpha$ . Конкретные релевантные заболевания, которые могут лечиться молекулой антитела данного изобретения, включают в себя сепсис, застойную сердечную недостаточность, септический или эндотоксический шок, кахексию, респираторный

дистресс-синдром взрослых, СПИД, аллергии, псориаз, туберкулез, воспалительные костные нарушения, нарушения, связанные с коагуляцией крови, ожоги, случаи отторжения после трансплантации органов или тканей, болезнь Крона и аутоиммунные заболевания, такие как тиреоидит и ревматоидный артрит или остеоартрит.

5 Дополнительно, молекула или композиция антитела может быть использована для уменьшения побочных эффектов, связанных с генерированием  $TNF\alpha$  во время неопластической терапии; для элиминации или уменьшения связанных с шоком симптомов, ассоциированных с лечением или предупреждением отторжения трансплантата с использованием антител против лимфоцитов; или для лечения недостаточности  
10 многочисленных органов.

Молекулу антитела данного изобретения предпочтительно используют для лечения ревматоидного артрита или остеоартрита.

Данное изобретение обеспечивает также способ лечения субъектов-людей или субъектов-животных, страдающих от нарушения или имеющих риск приобретения  
15 нарушения, опосредованного  $TNF\alpha$ , причем данный способ предусматривает введение данному субъекту эффективного количества молекулы антитела данного изобретения.

Молекула антитела данного изобретения может быть также использована в диагностике, например в диагностике *in vivo* и визуализации патологических состояний, при которых  
наблюдаются повышенные уровни  $TNF\alpha$ .

20 Данное изобретение обеспечивает также молекулу антитела, содержащую гибридный CDR, включающий в себя укороченную донорскую последовательность CDR, причем отсутствующая часть укороченной донорской CDR заменена отличающейся последовательностью и образует функциональный CDR. Термин «гибридный CDR» в применении здесь означает CDR, содержащий донорский CDR, который был укорочен при  
25 одном или нескольких положениях, например на одном или обоих его концах.

Отсутствующая часть укороченного донорского CDR заменена отличающейся последовательностью для образования полной и функциональной CDR. Гибридная CDR имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с полной донорской CDR. Последовательность, заменяющая укороченную часть CDR, может быть любой  
30 последовательностью. Предпочтительно недонорской частью данной последовательности CDR является последовательность из антитела, из которого получены каркасные области данной молекулы антитела, например последовательность антитела зародышевой линии.

Было обнаружено, что молекулы антител, содержащие гибридный CDR, сохраняют по существу такую же связывающую аффинность, что и молекула антитела, содержащая  
35 полные донорские CDR. Термин «по существу та же самая связывающая аффинность» в применении здесь означает по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 85% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% связывающей аффинности соответствующей молекулы антитела, содержащей полные донорские CDR. Как отмечалось выше, в некоторых случаях аффинность антитела данного изобретения может  
40 быть более высокой, чем аффинность донорского антитела. Применение гибридного CDR обеспечивает преимущество снижения количества чужеродной (т.е. донорской) последовательности, присутствующего в молекуле антитела, и может увеличивать связывающую аффинность молекулы этого антитела по сравнению с соответствующей молекулой антитела, содержащей полные донорские CDR.

45 Любой из CDR молекулы антитела может быть гибридным. Предпочтительно CDR2 тяжелой цепи является гибридом в данной молекуле антитела.

Предпочтительно укорочение донорского CDR составляет от 1 до 8 аминокислот, более предпочтительно от 4 до 6 аминокислот. Кроме того, предпочтительно, чтобы укорочение было произведено при С-конце CDR.

50 В зависимости от последовательности укороченной части CDR и отличающейся последовательности, заменяющей отсутствующую часть, может быть произведен ряд аминокислотных замен. Предпочтительно производят по меньшей мере 2 аминокислотные замены, более предпочтительно по меньшей мере 3 аминокислотные замены и наиболее

предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислотные замены.

Конкретным вариантом данного аспекта данного изобретения является антитело, соответствующее первому аспекту данного изобретения, в котором второй CDR в тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 2. Оно имеет более

5 высокую аффинность в отношении его антигена, чем донорское антитело, из которого произведена часть данного CDR.

Данное изобретение обеспечивает также последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу антитела, содержащую гибридный CDR данного изобретения.

Данное изобретение обеспечивает также экспрессирующий вектор, содержащий

10 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу антитела, содержащую гибридный CDR данного изобретения.

Данное изобретение обеспечивает также клетку-хозяина, трансформированную вектором данного изобретения.

Данное изобретение обеспечивает также способ получения молекулы антитела,

15 содержащей гибридный CDR, предусматривающий культивирование клетки-хозяина данного изобретения и выделение молекулы антитела.

Данное изобретение описывается далее только для целей иллюстрации в следующих примерах, которые ссылаются на сопутствующие фигуры, в которых:

Фигура 1 показывает каркасные области подгруппы 1 легкой цепи человека по сравнению с каркасными областями легкой цепи hTNF40 (SEQ ID NO: 83-90).

20 Фигура 2 показывает каркасные области подгруппы 1 и подгруппы 3 тяжелой цепи человека по сравнению с каркасными областями тяжелой цепи hTNF40 (SEQ ID NO: 91-98 и 106-109).

Фигура 3 показывает аминокислотную последовательность CDR hTNF40 (SEQ ID NO: 1-

25 7), где CDR H2' является гибридным CDR, в котором С-концевые шесть аминокислот являются аминокислотами из CDR-последовательности H2 антитела зародышевой линии подгруппы 3 человека, и аминокислотные замены в данной последовательности, происходящие в результате такой гибридизации, являются подчеркнутыми.

Фигура 4 показывает вектор pMR15.1.

Фигура 5 показывает вектор pMR14.

30 Фигура 6 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность мышинового hTNF40V1 (SEQ ID NO: 99).

Фигура 7 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность мышинового hTNF40Vh (SEQ ID NO: 100).

Фигура 8 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8).

35 Фигура 9 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9).

Фигура 10 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10).

40 Фигура 11 показывает нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательность gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11).

Фигура 12 показывает вектор CTIL5-gL6.

Фигура 13 показывает структуру соединения, названного CDP870, содержащего

45 модифицированный Fab-фрагмент, полученный из антитела hTNF40, ковалентно связанный через остаток цистеина с лизилмалеимидным линкером, причем каждая аминокислотная группа на лизил-остатке имеет ковалентно присоединенный к ней метокси-ПЭГ-остаток, где n равно приблизительно 420.

Фигура 14 показывает вектор pTTQ9.

Фигура 15 показывает последовательность олигонуклеотидного адаптера OmpA (SEQ ID

50 NO: 101).

Фигура 16 показывает вектор pACYC184.

Фигура 17 показывает вектор pТТО-1.



Фигура 18 показывает вектор pTTO-2.

Фигура 19 показывает вектор pDNAEng-G1.

Фигура 20 показывает олигонуклеотидные кассеты, кодирующие различные межгенные последовательности для экспрессии модифицированного Fab E.coli (SEQ ID NO: 102-105);

5 Фигура 21 показывает накопление модифицированного Fab в периплазме вариантов IGS.

Фигура 22 показывает вектор pTTO (CDP870).

10 Фигура 23 показывает балльную оценку активности заболевания (DAS) у пациентов, получавших различные дозы CDP870 и плацебо. Медиана и диапазоны IQ представлены для группы больных, согласно протоколу, в которой последнее наблюдение свидетельствует об улучшении. Малые квадраты показывают плацебо, ромбы показывают 1 мг/кг, треугольники показывают 5 мг/кг и большие квадраты показывают 20 мг/кг.

15 Фигура 24 показывает число болезненных суставов, число распухших суставов, балльную оценку боли, глобальную оценку активности заболевания медицинским экспертом, модифицированную анкету оценки здоровья (HAQ), С-реактивный белок (CRP) и скорость оседания эритроцитов (ESR) у пациентов, получавших различные дозы CDP870 и плацебо. Медиана и диапазон IQ представлены для группы больных, согласно протоколу, в которой последнее наблюдение свидетельствует об улучшении. Малые квадраты показывают плацебо, ромбы показывают 1 мг/кг, треугольники показывают 5 мг/кг и  
20 большие квадраты показывают 20 мг/кг.

#### ПРИМЕРЫ

Клонирование и экспрессия генов химерной молекулы антитела hTNF40

Получение РНК из гибридомных клеток hTNF40

Тотальную РНК получали из  $3 \times 10^7$  гибридомных клеток hTNF40, как описано ниже.

25 Клетки промывали в физиологическом солевом растворе и растворяли в РНКзоле (0,2 мл на  $10^6$  клеток). Добавляли хлороформ (0,2 мл на 2 мл гомогената), смесь интенсивно встряхивали в течение 15 секунд и затем оставляли на льду на 15 минут. Полученные водную и органическую фазы разделяли центрифугированием в течение 15 минут в центрифуге Эппендорфа и РНК осаждали из водной фазы добавлением равного объема  
30 изопропанола. После 15 минут выдерживания на льду РНК осаждали центрифугированием, промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в стерильной не содержащей РНКазы воде. Выход РНК был 400 мкг.

ПЦР-клонирование Vh и VI hTNF40

35 кДНК-последовательности, кодирующие переменные домены тяжелой и легкой цепей hTNF40, синтезировали с использованием обратной транскриптазы для получения одноцепочечных кДНК-копий мРНК, присутствующей в тотальной РНК, с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) на данных кДНК со специфическими олигонуклеотидными праймерами.

а) Синтез кДНК

40 кДНК синтезировали в реакционном объеме 20 мкл, содержащем следующие реагенты: 50 mM Трис-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 10 mM дитиотреитол, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM каждый из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 20 единиц RNAsin, 75 нг рандомизированного гексануклеотидного праймера, 2 мкг РНК hTNF40 и 200 единиц обратной транскриптазы вируса мышиного лейкоза Moloney. После инкубирования при 42°C в течение 60 минут  
45 реакцию останавливали нагреванием при 95°C в течение 5 минут.

б) ПЦР

50 Аликвоты кДНК подвергали ПЦР с использованием комбинации праймеров, специфических для тяжелой и легкой цепей. Нуклеотидные последовательности 5'-праймеров для тяжелой и легкой цепей показаны в таблицах 1 и 2 соответственно. Все последовательности содержат в следующем порядке: сайт рестрикции, начинающийся после 7 нуклеотидов от их 5'-концов, последовательность GCCGCCACC (SEQ ID NO: 12) для оптимальной трансляции полученных мРНК, иницирующий кодон и 20-30 нуклеотидов на основе последовательностей лидерных пептидов известных мышинных антител (Kabat et

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

3'-праймеры показаны в таблице 3. Праймер легкой цепи простирается через J-C-соединение антитела и содержит сайт рестрикции для фермента SphI для облегчения клонирования ПЦР-фрагмента VI. 3'-праймеры тяжелой цепи являются смесью, сконструированной для того, чтобы простирались через J-C-соединение антитела. 3'-Праймер включает в себя сайт рестрикции ApaI для облегчения клонирования. 3'-район данных праймеров содержит смешанную последовательность на основе последовательностей, обнаруженных в известных мышинных антителах (Kabat et al., 1991 (supra)).

Описанные выше комбинации праймеров позволяют клонировать ПЦР-продукты для Vh и VI непосредственно в подходящий экспрессирующий вектор (см. ниже) для получения химерных (мышь-человек) тяжелой и легкой цепей и экспрессировать эти гены в клетках млекопитающих с получением химерных антител желательного изотипа.

Инкубирования (100 мкл) для ПЦР устанавливали следующим образом. Каждая реакция содержала 10 mM Трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,01% масса/объем желатин, 0,25 mM каждый дезоксирибонуклеозидтрифосфат, 10 пмоль смеси 5'-праймеров (таблица 4), 10 пмоль 3'-праймера (CL12 (легкая цепь) или R2155 (тяжелая цепь) (таблица 3)), 1 мкл кДНК и 1 единица полимеразы Taq. Реакции инкубировали при 95°C в течение 5 минут и затем проводили циклы при 94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После 30 циклов аликвоты каждой реакции анализировали электрофорезом на агарозном геле. Реакции легкой цепи, содержащие смеси 5'-праймеров из пулов 1, 2 и 7 легкой цепи, давали полосы с размерами, согласующимися с полноразмерными VI-фрагментами, тогда как реакция из пула 3 реакции тяжелой цепи давала фрагмент с размером, ожидаемым для гена Vh. Полоса, даваемая праймерами пула 1 легкой цепи, не обрабатывалась до конца, так как предварительные результаты показали, что данная полоса соответствует псевдогену легкой цепи, продуцируемому гибридной клеткой. Полоса, производимая праймерами пула 7 легкой цепи, была более слабой, чем полоса из праймеров пула 2, и, следовательно, не обрабатывалась до конца. Только полосу из пула 2 реакции легкой цепи, которая была наиболее сильной полосой, прослеживали до конца.

#### с) Молекулярное клонирование ПЦР-фрагментов

ДНК-фрагменты, продуцируемые в пуле 2 реакции легкой цепи, расщепляли ферментами BstBI и SphI, концентрировали осаждением этанолом, подвергали электрофорезу на 1,4% агарозном геле и полосы ДНК в диапазоне 400 п.н. извлекали. Их клонировали лигированием в вектор pMR15.1 (фигура 4), который был расщеплен с помощью BstBI и SphI. После лигирования смеси трансформировали в E.coli LM 1035 и плазмиды из полученных бактериальных колоний подвергали скринингу на вставки расщеплением BstBI и SphI. Характерные плазмиды со вставками из каждого лигирования анализировали далее секвенированием нуклеотидов.

Подобным образом, ДНК-фрагменты, продуцируемые в пуле 3 реакции тяжелой цепи, расщепляли HindIII и ApaI и клонировали в вектор pMRI4 (фигура 5), который был расщеплен HindIII и ApaI. Характерные плазмиды, содержащие вставки, анализировали секвенированием нуклеотидов.

#### d) Анализ нуклеотидной последовательности

Плазмидную ДНК из ряда изолятов, содержащих Vh-вставки, секвенировали с использованием праймеров R1053 (см. таблицу 5) (который праймирует в 3'-районе промотора HCMV в pMR14) и R720 (см. таблицу 5) (который праймирует в 5'-районе С-гамма 4 человека и позволяет проводить секвенирование через ДНК-вставку на pMR14). Было обнаружено, что нуклеотидные последовательности Vh-вставки в ряде клонов были идентичными, за исключением различий в районе сигнального пептида и J-районе. Это указывает на то, что исследованные клоны являются независимыми изолятами, возникающими вследствие применения различных праймеров из смеси олигонуклеотидов

во время ПЦР-стадии. Определенная нуклеотидная последовательность и предсказанная аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела hTNF40 (hTNF40Vh) приведены на фигуре 7 (SEQ ID NO: 100).

Для анализа клонов легкой цепи исследовали последовательность, полученную из праймирования R1053 (см. таблицу 5) и R684 (SEQ ID NO: 62) (который праймирует в 5'-районе С-каппа человека и позволяет проводить секвенирование через ДНК-вставку на pMR15.1). Нуклеотидную последовательность и предсказанную аминокислотную последовательность генов VI, возникающих из реакций в пуле 2, анализировали аналогичным образом. Опять было обнаружено, что нуклеотидные последовательности VI-вставки в ряде клонов были идентичными, за исключением различий в районе сигнального пептида и J-районе, что показывает, что исследованные клоны были независимыми изолятами, возникающими вследствие применения различных праймеров из смеси олигонуклеотидов, используемой во время ПЦР-стадии. Определенная нуклеотидная последовательность и предсказанная аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела hTNF40 (hTNF40V1) приведены на фигуре 6 (SEQ ID NO: 99).

### ТАБЛИЦА 1

#### Олигонуклеотидные праймеры для 5'-района мышинных

20

#### тяжелых цепей

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)

25

CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTTGGTAAACTGGGTTTT3' (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)

30

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)

35

CH10 : 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT3' (SEQ ID NO:22)

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

CH12 : 5'ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

40

Каждый из приведенных выше праймеров имеет последовательность

5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:25), добавленную к его 5'-

концу.

45

50

## ТАБЛИЦА 2

Олигонуклеотидные праймеры для 5'-районов мышинных

5

легких цепей

- CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:26)
- CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEQ ID NO:27)
- 10 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)
- 15 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)
- 20 CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3'(SEQ ID NO:34)
- CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)
- 25 CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTTC3' (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)
- 30 CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)
- CL13 : 5'ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)
- CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)
- 35 CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)
- CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)
- CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)
- 40 CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)
- CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

Каждый из приведенных выше праймеров имеет последовательность

45 5'GGACTGTTTCGAAGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:47), добавленную к его

5'-концу.

50

## ТАБЛИЦА 3

Олигонуклеотидные праймеры для 3'-конца мышинных генов Vh и Vl.

5 Легкая цепь (CL12):

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

Тяжелая цепь (R2155):

10

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

**(SEQ ID NO:49)**

## ТАБЛИЦА 4

15

а) смеси 5'-праймеров для ПЦР-реакции легкой цепи

пул 1: CL2.

20

пул 2: CL7.

пул 3: CL13.

пул 4: CL6.

25

пул 5: CL5A, CL9, CL17A.

пул 6: CL8.

пул 7: CL12A

30

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

35

б) смеси 5'-праймеров для ПЦР-реакций тяжелой цепи

пул 1: CH1, CH2, CH3, CH4.

40

пул 2: CH5, CH6, CH7, CH8.

пул 3: CH9, CH10, CH11, CH12.

## Таблица 5

45

Праймеры, используемые для анализа нуклеотидной последовательности

R1053: **5' GCTCACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEQ ID NO:50)**

50

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

Оценка активности химерных генов

Активности химерных генов оценивали экспрессией их в клетках млекопитающих и

очисткой и количественным определением вновь синтезированных антител. Методология для этого описана ниже, с последующим описанием биохимических анализов и анализов на основе клеток, используемых для биологической характеристики данных антител.

а) Получение химерной молекулы антитела hTNF40

5 Химерное антитело для биологической оценки получали временной экспрессией подходящих пар тяжелой и легкой цепей после котрансфекции в клетки яичника Китайского хомячка (CHO) с использованием осаждения фосфатом кальция.

В день перед трансфекцией полуконфлюентные колбы с клетками CHO-L761 трипсинизировали, клетки считали и колбы T75 устанавливали таким образом, что каждая  
10 содержала  $10^7$  клеток.

На следующий день культуральную среду меняли за 3 часа перед трансфекцией. Для трансфекции кальций-фосфатный осадок получали смешиванием 1,25 мл 0,25 М  $\text{CaCl}_2$ , содержащего 50 мкг каждого из экспрессирующих векторов тяжелой и легкой цепей, с 1,25 мл 2xHBS (16,36 г NaCl, 11,0 г HEPES и 0,4 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в 1 литре воды с pH, доведенным  
15 до 7,1 при помощи NaOH) и добавлением непосредственно в среду данных клеток. После 3 часов при 37°C в  $\text{CO}_2$ -термостате среду и осадок извлекали и клетки подвергали шоку добавлением 15 мл 15% глицерина в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ) в течение 1 минуты. Глицерин удаляли, клетки промывали один раз ФСБ и инкубировали в течение 48-96 часов в 25 мл среды, содержащей 10 мМ бутират натрия. Антитело можно  
20 было очистить из культуральной среды связыванием с протеин А-сефарозой и элюцией с протеин А-сефарозы.

б) ELISA

Для ELISA планшеты Nunc ELISA покрывали в течение ночи при 4°C F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального козьего специфического против Fc-фрагмента человека антитела  
25 (Jackson Immunoresearch, code 109-006-098) при 5 мкг/мл в буфере для нанесения покрытия (15 мМ карбонат натрия, 35 мМ гидрокарбонат натрия, pH 6,9). Несвязавшееся антитело удаляли промыванием 5 раз дистиллированной водой. Пробы и очищенные стандарты, подлежащие количественному определению, разбавляли до приблизительно 1 мкг/мл в буфере для конъюгации (0,1 М Tris-HCl, pH 7,0, 0,1 М NaCl, 0,2% об/об Твин 20,  
30 0,2% масса/об казеин Hammersten). Пробы титровали в микротитрационных лунках в 2-кратных разведениях с получением конечного объема 0,1 мл в каждой лунке и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со встряхиванием. После первой инкубационной стадии планшеты промывали 10 раз дистиллированной водой и затем инкубировали в течение 1 часа, как и прежде, с 0,1 мл мышинового моноклонального  
35 антитела против каппа человека (клона GD12), конъюгированного с пероксидазой (The Binding Site, code MP135), при разведении 1 в 700 в буфере для конъюгации. Планшет промывали опять и в каждую лунку добавляли раствор субстрата (0,1 мл). Раствор субстрата содержал 150 мкл N,N,N,N-тетраметилбензидина (10 мг/мл в ДМСО), 150 мкл пероксида водорода (30% раствор) в 10 мл 0,1 М ацетат натрия/цитрат натрия, pH 6,0.  
40 Планшет проявляли в течение 5-10 минут, пока поглощение при 630 нм не было приблизительно 1,0 для верхнего стандарта. Поглощение при 630 нм измеряли с использованием планшет-ридера и концентрацию пробы определяли сравнением кривых титрования с кривыми стандарта.

с) Определение констант аффинности (средства) с использованием BiaCore-анализа

45 Связывающее взаимодействие между hTNF40 и TNF человека исследовали с использованием технологии BIA. Аффинно очищенные козы поликлональные антитела, направленные против константной области hTNF40, иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа декстранового полимера при помощи стандартной химии NHS/EDC. Относительно низкие уровни (200-500 RU) hTNF40 иммобилизовали для гарантии  
50 минимизации эффекта массопереноса. TNF человека при различных концентрациях пропускали через иммобилизованное hTNF40 для оценки кинетики ассоциации. После инъекции лиганда буфер пропускали через данную поверхность таким образом, что можно было измерить диссоциацию. Константы скоростей ассоциации и диссоциации для

взаимодействия между твердофазным hTNF40 и TNF человека рассчитывали и определяли величину  $K_D$ .

#### ПРИМЕР 1

##### CDR-пересадка (прививка) hTNF40

5 Молекулярное клонирование генов для переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела hTNF40 и их применение для получения химерных (мышь-человек) антител hTNF40 было описано выше. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> мышиногo hTNF40 показаны на фигурах 6 и 7 (SEQ ID NO:99 и 100) соответственно. Данный пример описывает CDR-прививку антитела hTNF40.

##### 10 CDR-прививка легкой цепи hTNF40

Сопоставление выстраиванием каркасных областей легкой цепи hTNF40 с каркасными областями четырех подгрупп легких цепей человека (Kabat et al., 1991 (supra)) выявило, что hTNF40 был наиболее гомологичным антителам в подгруппе 1 легкой цепи человека. Поэтому для конструирования CDR-привитой легкой цепи выбранные каркасные 15 области соответствовали каркасным областям консенсусной последовательности группы 1 человека.

Сравнение аминокислотных последовательностей каркасных областей мышиногo hTNF40 и консенсусных легких цепей группы 1 человека представлено на фигуре 1 и показывает, что имеются 22 различия (подчеркнутые) между данными двумя 20 последовательностями. Анализ влияния, которое любое из каркасных различий может оказывать на связывание антигена, идентифицировал 2 остатка для исследования; они находятся в положениях 46 и 60. На основе этого анализа были сконструированы две версии CDR-привитой легкой цепи. В первой из них, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8), остатки 46 и 60 происходят из легкой цепи hTNF40, тогда как во второй, hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 25 9), все остатки являются согласующимися с остатками человека, за исключением остатка с номером 60, который является остатком из легкой цепи hTNF40.

Конструирование hTNF40-gL1, CDR-привитой легкой цепи

Конструирование hTNF40-gL1 дается подробно ниже. Следующие перекрывающиеся олигонуклеотиды (P7982-P7986) использовали в полимеразных цепных реакциях (ПЦР) для 30 сборки укороченной прививаемой легкой цепи. Собранный фрагмент не содержит лидерной последовательности антитела и первых 17 аминокислот каркасной области 1.

олигонуклеотид 1 P7982:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTAATAACGTAGCCTGGTATCAGCAA3' (SEQ ID NO: 52)

35 олигонуклеотид 2 P7983:

5'ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTTACCTGGTTT TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEQ ID NO: 53)

олигонуклеотид 3 P7984:

40 5'TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTTCAGCGGATCCG GTAGTGGTACTGATTTTAC3' (SEQ ID NO: 54)

олигонуклеотид 4 P7985:

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

олигонуклеотид 5 P7986:

45 5'ATTTCCGCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCGGT CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEQ ID NO: 56)

Fwd P7981:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (SEQ ID NO: 57)

Fwd P7980:

50 5'GAATTCGATACGTTTGTATTTCTACTTTAGT3' (SEQ ID NO: 58)

ПЦР-реакцию, 100 мкл, устанавливали таким образом, что она содержала 10 мМ Трис-HCl pH 8,3, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,01% масса/об желатин, 0,25 мМ каждый дезоксирибонуклеозид-трифосфат, 2 пмоль P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 пмоль

R7980, R7981 и 1 единицу полимеразы Taq. Реакции проводили с циклами 94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После 30 циклов каждую реакцию анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле и ПЦР-фрагмент вырезали из геля и извлекали с использованием набора Mermaid. Извлеченный фрагмент

5 расщепляли ферментами BstEII и SphI в подходящем буфере. Полученный продукт в конце концов подвергали электрофорезу в агарозном геле и ДНК-фрагмент размером 270 п.н. извлекали из среза геля и лигировали в вектор CTIL5-gL6 (фигура 12), который был

10 предварительно расщеплен теми же самыми ферментами. Вышеуказанный вектор обеспечивает отсутствующую лидерную последовательность антитела и первые 17 аминокислот каркасной области 1.

Смесь для лигирования использовали для трансформации штамма E.coli LM1035 и полученные колонии анализировали при помощи ПЦР, расщеплений рестриктазами и нуклеотидного секвенирования. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность VI-области hTNF40-gL1 показана на фигуре 8 (SEQ ID NO: 8).

15 Конструирование hTNF40-gL2, CDR-привитой легкой цепи hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9) конструировали с использованием ПЦР. Следующие олигонуклеотиды использовали для введения аминокислотных замен:

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

R5350: 5'TCTAGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTGATGCAGCATAGAT

20 CAGGAGCTTAGGAGC3' (SEQ ID NO: 60)

R5349: 5'GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTTCAGTGGCAGTGGATCA

GGCACAGACTTTACCCTAAC3' (SEQ ID NO: 61)

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

Две реакции, каждая по 20 мкл, устанавливали таким образом, что они содержали 10 mM

25 Трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,01% масса/об желатин, 0,25 mM каждый дезоксирибонуклеозидтрифосфат, 0,1 мкг hTNF40-gL1, 6 пмоль R1053/R5350 или R5349/R684 и 0,25 единиц полимеразы Taq. Реакции проводили с циклами 94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После 30 циклов каждую реакцию анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле и ПЦР-фрагменты

30 вырезали из геля и извлекали с использованием набора Mermaid.

Аликвоты этих фрагментов подвергали затем второму раунду ПЦР. Реакция, 100 мкл, содержала 10 mM Трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM KCl, 0,01% масса/об желатин, 1/5 каждого из ПЦР-фрагментов из первого набора реакций, 30 пмоль R1053 и R684 и 2,5 единиц полимеразы Taq. Температуры реакции были такими же, что и описанные выше.

35 После ПЦР смесь экстрагировали смесью фенол/хлороформ и затем хлороформом и осаждали этанолом. Этанольный осадок извлекали центрифугированием, растворяли в подходящем буфере и расщепляли ферментами BstEII и SphI. Полученный продукт наконец подвергали электрофорезу в агарозном геле и ДНК-фрагмент размером 270 п.н. извлекали

40 из среза геля и лигировали в вектор pMR15.1 (фигура 4), который был предварительно расщеплен теми же самыми ферментами.

Смесь для лигирования использовали для трансформации штамма E.coli LM1035 и полученные колонии анализировали при помощи ПЦР, расщеплений рестриктазами и нуклеотидного секвенирования. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность VI-области hTNF40-gL2 показана на фигуре 9 (SEQ ID NO:9).

45 CDR-прививка тяжелой цепи hTNF4Q

CDR-прививку тяжелой цепи hTNF40 выполняли с использованием той же самой стратегии, которая описана для легкой цепи. Было обнаружено, что тяжелая цепь является наиболее гомологичной тяжелым цепям человека, принадлежащим к подгруппе 1, и поэтому консенсусная последовательность каркасных областей подгруппы 1 человека

50 была выбрана для акцептирования CDR тяжелой цепи hTNF40.

Для исследования необходимости гомологичной каркасной области человека для использования в качестве акцепторного каркаса для CDR-прививки вторая каркасная область, группы 3 человека, была выбрана для гуманизации тяжелой цепи hTNF40.



Сравнение hTNF40 с двумя различными каркасными областями показано на фигуре 2, где можно видеть, что hTNF40 отличается от консенсуса подгруппы 1 человека в 32 положениях (подчеркнутых) и отличается от консенсуса подгруппы 3 человека в 40 положениях (подчеркнутых). После анализа влияния, которое каждое из этих различий может производить на связывание антигена, остатки 28, 38, 46, 67, 69 и 71 сохраняли в качестве доноров в gh1hTNF40.1, CDR-привитой тяжелой цепи, с использованием каркаса группы 1. Остатки 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 и 78 сохраняли в качестве донора в gh3hTNF40.4, CDR-привитой тяжелой цепи, с использованием каркаса группы 3. Остатки 28, 69 и 71 сохраняли в качестве донора в gh1hTNF40.4, CDR-привитой тяжелой цепи, с использованием каркаса группы 1.

Конструирование gh1hTNF40.4, CDR-привитой тяжелой цепи gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10) собирали подверганием перекрывающихся олигонуклеотидов ПЦР в присутствии подходящих праймеров. Следующие олигонуклеотиды использовали в ПЦР:

15 Трансплантат группы 1 олигонуклеотид 1 P7989:  
 5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG  
 AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO: 63)  
 олигонуклеотид 2 P7990:  
 5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC  
 20 GTGTTACAGACTATGGTA3' (SEQ ID NO: 64)  
 олигонуклеотид 3 P7991:  
 5'CCAACCCATCCATTTTCAGGCCTTGTCCCGGGGCCTGCTTGACCCAATTCATAC  
 CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEQ ID NO: 65)  
 олигонуклеотид 4 P7995:  
 25 5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
 TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTTC3' (SEQ ID NO: 66)  
 олигонуклеотид 5 P7992:  
 5'CCATGTATGCAGTGCCTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTT  
 GAA3' (SEQ ID NO: 67)  
 30 олигонуклеотид 6 P7993:  
 5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCGC  
 AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO: 68)  
 олигонуклеотид 7 P7994:  
 5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG  
 35 CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO: 69)  
 Fwd: P7988:  
 5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO: 70)  
 Bwd P7987:  
 5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO: 71)

40 Реакция сборки, 100 мкл, содержала 10 мМ Трис-HCl pH 8,3, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,01% масса/об желатин, 0,25 мМ каждый дезоксирибонуклеозидтрифосфат, 2 пмоль каждого из p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 и p7994, 10 пмоль каждого из p7988 и p7987 и 1 единицу полимеразы Taq. Реакции проводили с циклами 94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После 30 циклов реакцию экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1/1), затем хлороформом и осаждали этанолом.  
 45 После центрифугирования ДНК растворяли в подходящем буфере и расщепляли AraI и KpnI. Полученный фрагмент выделяли из агарозного геля и лигировали в pMR14 (фигура 5), который был предварительно расщеплен теми же самыми ферментами. pMR14 содержит константную область тяжелой цепи гамма 4 человека; когда pMR14 расщепляют  
 50 AraI и KpnI, расщепленный вектор способен принимать расщепленную ДНК, так что 3'-конец расщепленной ДНК соединяется в рамке считывания с 5'-концом последовательности, кодирующей константную область гамма 4. Таким образом, тяжелая цепь, экспрессируемая из данного вектора, будет иметь изотип гамма 4. Смесь для

лигирования использовали для трансформации *E.coli* LM1035 и полученные бактериальные колонии подвергали скринингу посредством расщепления рестриктазами и анализа нуклеотидной последовательности. Таким путем идентифицировали плазмиду, содержащую правильную последовательность для gh1hTNA40.4 (фигура 10) (SEQ ID NO: 10).

Конструирование gh3hTNF40.4, CDR-привитой тяжелой цепи gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) собирали подверганием перекрывающихся олигонуклеотидов ПЦР в присутствии подходящих праймеров. Следующие олигонуклеотиды использовали в ПЦР:

Трансплантат группы 3

олигонуклеотид 1 P7999:

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

олигонуклеотид 2 P8000:

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

олигонуклеотид 3 P8001:

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

олигонуклеотид 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTTC3' (SEQ ID NO: 66)

олигонуклеотид 5 P7997:

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

олигонуклеотид 6 P7998:

5'CCAAGTCAACAGCATACTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC  
AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO: 76)

олигонуклеотид 7 P7993:

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

Fwd P7996:

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTTC3' (SEQ ID NO: 78)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO: 71)

Реакция сборки, 100 мкл, содержала 10 мМ Трис-HCl pH 8,3, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,01% масса/об желатин, 0,25 мМ каждый дезоксирибонуклеозидтрифосфат, 2 пмоль каждого из p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 и p7993, 10 пмоль каждого из p7996 и p7987 и 1 единицу полимеразы Taq. Реакции проводили с циклами 94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После 30 циклов реакцию экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1/1), затем хлороформом и осаждали этанолом. После центрифугирования ДНК растворяли в подходящем буфере для рестрикции расщепляли AraI и KpnI. Полученный фрагмент выделяли из агарозного геля и лигировали в pMR14 (фигура 5), который был предварительно расщеплен теми же самыми ферментами. pMR14 содержал константную область тяжелой цепи гамма 4 человека. Когда pMR14 расщепляют AraI и KpnI, расщепленный вектор способен принимать расщепленную ДНК, так что 3'-конец расщепленной ДНК соединяется в рамке считывания с 5'-концом последовательности, кодирующей константную область гамма 4. Таким образом, тяжелая цепь, экспрессируемая из этого вектора, будет иметь изотип гамма 4. Смесью для лигирования использовали для трансформации *E.coli* LM1035 и полученные бактериальные колонии подвергали скринингу посредством расщепления рестриктазами и анализа нуклеотидной последовательности. Таким путем идентифицировали плазмиду, содержащую правильную последовательность для gh3hTNF40.4 (фигура 10) (SEQ ID NO:

11).

Получение CDR-привитого модифицированного Fab-фрагмента

CDR-привитый, модифицированный Fab-фрагмент, на основе антитела hTNF40, конструировали с использованием вектора рТТО-1 E.coli. Вариабельные области антитела hTNF40 субклонировали в этот вектор и межгенную последовательность оптимизируют для получения рТТО(CDP870). Данный экспрессирующий вектор рТТО предназначен для вызывания накопления в периплазме растворимых рекомбинантных белков в E.coli. Основными признаками этой плазмиды являются:

(i) маркер устойчивости к тетрациклину - антибиотик не инактивировался продуктом гена устойчивости, так что поддерживается отбор на плазмидусодержащие клетки;

(ii) низкая копияность - начало репликации, происходящее из плазмиды p15A, которое совместимо с плазмидами, содержащими происходящими из colE1 репликационными;

(iii) сильный индуцируемый промотор tac для транскрипции клонируемого гена (генов);

(iv) lacI<sup>q</sup> ген - дает конститутивную экспрессию lac-репрессорного белка,

поддерживающего промотор tac в репрессированном состоянии, пока он не индуцируется IPTG/аллолактозой;

(v) сигнальная последовательность OmpA - дает периплазматическую секрецию клонированного гена (генов); и

(vi) трансляционное связывание сигнальной последовательности OmpA с коротким пептидом lacZ, дающее эффективную инициацию трансляции.

Данный вектор был создан для экспрессии модифицированных Fab-фрагментов из дицистронной матрицы посредством создания способа для отбора эмпирически оптимальной межгенной последовательности из ряда четырех сконструированных целенаправленно кассет. Описано применение данного способа в конструировании рТТО(CDP870).

Материалы и способы

Способы ДНК

Стандартные процедуры использовали для протоколов, в том числе рестрикцию ДНК, электрофорез в агарозном геле, лигирование и трансформацию. Рестриктазы и модифицирующие ДНК ферменты получали из New England Biolabs или Boehringer Mannheim и использовали их в соответствии с рекомендациями изготовителей. ДНК-фрагменты очищали от агарозы с использованием протокола GeneClean (BIO 101). Олигонуклеотиды получали из Oswell Oligonucleotide Service и синтезировали при масштабе 40 нм. Плазмидную ДНК выделяли с использованием наборов Plasmid DNA Mini/Midi kits из Qiagen. ПЦР выполняли с использованием «Amplitaq» Perkin Eitner в соответствии с рекомендациями. Секвенирование ДНК проводили с использованием набора для секвенирования Applied Biosystems Taq cycle sequencing kit.

Индукция во встряхиваемых колбах

Культуры E.coli W3110 выращивали в L-бульоне, дополненном тетрациклином (7,5 мкг/мл). Для индукций свежие ночные культуры (росшие при 30°C) разбавляли до OD<sub>600</sub> 0,1 в 200 мл L-бульона в колбе с перегородкой на 2 л и выращивали при 30°C в орбитальном термостате. При OD<sub>600</sub> 0,5 добавляли IPTG до 200 мкМ. Пробы (нормализованные в отношении OD) брали с интервалами.

Экстракция периплазмы

Пробы культуры охлаждали на льду (5 минут), затем клетки собирали центрифугированием. После ресуспендирования в буфере для экстракции (100 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 7,4) пробы инкубировали в течение ночи при 30°C, затем осветляли центрифугированием.

Анализ сборки

Концентрации модифицированного Fab определяли при помощи ELISA. Планшеты покрывали при 4°C в течение ночи антителом против Fd 6045 человека (2 мкг/мл в буфере для нанесения покрытия, физиологический солевой раствор, 100 мкл на лунку). После промывания 100 мкл пробы вносили на лунку; очищенный A5 B7 гамма-1 Fab<sup>1</sup>, исходно при

2 мкг/мл, использовали в качестве стандарта. Пробы серийно разводили 2-кратно по всему планшету в буфере для конъюгации проб (на литр: 6,05 г трисаминометана; 2,92 г NaCl; 0,1 мл Твина-20; 1 мл казеина (0,2%)); планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании. Планшеты промывали и сушили, затем добавляли 100 мкл антитела против С-каппа (GD12) человека, конъюгированного с пероксидазой (разбавленного буфером для проб для конъюгации). Инкубирование проводили при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании. Планшеты промывали и сушили, затем добавляли 100 мкл раствора субстрата (10 мл раствора ацетата/цитрата натрия (0,1 М рН 6); 100 мкл раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 100 мкл раствора тетраметилбензидина (10 мг/мл в диметилсульфоксиде)). Поглощение при 630 нм считывали спустя 4-6 минут после добавления субстрата.

Конструирование плазмиды рТТО-1

(а) Замена полилинкера рТТQ9

Плазида рТТQ9 была получена из Amersham и показана на фигуре 14. Аликвоту (2 мкг) расщепляли рестриктазами Sall и EcoRI, продукт расщепления подвергали электрофорезу на 1% агарозном геле и большой ДНК-фрагмент (4520 п.н.) очищали. Синтезировали два олигонуклеотида, которые при отжиге вместе кодируют полилинкерный район OmpA, показанный на фигуре 15. Данная последовательность имеет липкие концы, которые совместимы с концами Sall и EcoRI, генерируемыми рестрикцией рТТQ9. При клонировании данной олигонуклеотидной «кассеты» в вектор рТТQ9 сайт Sall не регенерируется, но сайт EcoRI сохраняется. Кассета кодирует первые 13 аминокислот сигнальной последовательности белка наружной мембраны E.coli Omp-A, перед которой находится сайт связывания рибосомы Шайна-Далгарно гена OmpA. Кроме того, присутствуют сайты рестрикции для ферментов XbaI, MunI, StyI и SphI. Сайты MunI, StyI и SphI находятся внутри кодирующего района сигнальной последовательности OmpA и предназначены в качестве 5'-клонировующих сайтов для инсерции генов. Два олигонуклеотида, которые образуют эту кассету, отжигали вместе смешиванием при концентрации 5 пмоль/мкл и нагреванием на водяной бане до 95°C в течение 3 минут и затем медленным охлаждением до комнатной температуры. Затем отожженную (гибридизованную) последовательность лигировали в разрезанный Sall/EcoRI вектор рТТQ9. Полученный плазмидный промежуточный продукт, названный рТQOmp, подтверждали ДНК-секвенированием.

(b) Получение и лигирование фрагментов

Плазмиду рТТО-1 конструировали лигированием одного ДНК-фрагмента из плазмиды рАСУС184 с двумя фрагментами, генерируемыми из рТQOmp. Плазмиду рАСУС184 получали из New England Biolabs и ее рестрикционная карта показана на фигуре 16. Аликвоту (2 мкг) расщепляли полностью рестриктазой StyI, затем обрабатывали нуклеазой маша (фасоли золотистой); такая обработка создает тупые концы отрезанием 5'-выступов оснований. После фенольной экстракции и осаждения этанолом ДНК расщепляли ферментом PvuII с образованием фрагментов размером 2348, 1081, 412 и 403 п.н. Фрагмент размером 2348 п.н. очищали после электрофореза на агарозном геле. Данный фрагмент кодирует маркер устойчивости к тетрациклину и сайт инициации репликации р14А. Затем данный фрагмент обрабатывали щелочной фосфатазой кишечника теленка для удаления 5'-концевых фосфатов, предотвращая тем самым самолигирование данной молекулы.

Аликвоту (2 мкг) плазмиды рТQOmp расщепляли ферментами SspI и EcoRI и фрагмент размером 2350 п.н. очищали от нежелательных фрагментов размером 2040 п.н. и 170 п.н. после электрофореза в агарозном геле; данный фрагмент кодирует район терминатора транскрипции и ген lacI<sup>q</sup>. Другую аликовоту (2 мкг) рТQOmp расщепляли EcoRI и XmnI с получением фрагментов размером 2289, 1670, 350 и 250 п.н. Фрагмент размером 350 п.н., кодирующий промотор tac, сигнальную последовательность OmpA и сайт мультиклонирования, очищали от геля.

Затем данные три фрагмента лигировали с использованием приблизительно эквимольных количеств каждого фрагмента для генерирования плазмиды рТТО-1. Все

клонирование проверяли ДНК-секвенированием. Рестрикционная карта данной плазмиды показана на фигуре 17. Затем создавали плазмиду рТТО-2 вставкой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи каппа 1g человека. Ее получали в виде фрагмента рестрикции SphI-EcoRI из плазмиды рHC132 и встраивали в соответствующие сайты в рТТО-1. Плаزمида рТТО-2 показана на фигуре 18.

Встраивание гуманизованных переменных областей hTNF40 в рТТО-2

hTNF40gL1 (SEQ ID NO:8), переменную область легкой цепи, получали посредством ПЦР-"спасения" из соответствующего вектора для экспрессии в клетках млекопитающих рMR10.1. Лидерная последовательность OmpA заменяет нативный лидер Ig.

Последовательность ПЦР-праймеров показана ниже:

5'-праймер:

CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGCTGACATT  
CAAATGACCCAGAGCCC (SEQ ID NO: 79)

3'-праймер: TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEQ ID NO: 80)

После ПЦР при стандартных условиях продукт очищали, расщепляли ферментами MunI и SphI и затем очищали от геля. Затем очищенный фрагмент вставляли в сайты MunI/SphI рТТО-2 для создания промежуточной плазмиды с легкой цепью рТТО (hTNF40L).

Переменную область тяжелой цепи gh3hTNF40.4 получали таким же образом из вектора р-гамма-4. Последовательность ПЦР-праймеров показана ниже:

5'-праймер:

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAGGT  
TCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEQ ID NO: 81)

3'-праймер: GCCTGAGTTCCACGACAC (SEQ ID NO: 82)

После ПЦР продукт очищали, расщепляли ферментами NheI и ApaI и затем субклонировали в вектор рDNAbEng-G1 (фигура 19). После подтверждения ДНК-секвенированием тяжелую цепь рестрицировали ферментом EcoRI и субклонировали в сайт EcoRI рТТО (hTNF40L) для создания экспрессионной плазмиды рТТО (hTNF40) E.coli.

Оптимизация межгенной последовательности для экспрессии модифицированного Fab В векторе рТТО экспрессия модифицированного Fab происходит из дицистронной

матрицы, кодирующей сначала легкую цепь, а затем тяжелую цепь. ДНК-последовательность между двумя генами (межгенная последовательность, IGS) может влиять на уровень экспрессии тяжелой цепи действием на скорость инициации трансляции. Например, короткая межгенная последовательность может приводить к трансляционному сопряжению между легкой и тяжелой цепями вследствие того, что транслирующая рибосома может не полностью диссоциироваться от мРНК после завершения синтеза легкой цепи перед инициацией синтеза тяжелой цепи. «Сила» любого сайта связывания рибосомы Шайна-Далгарно (SD) (гомология относительно рНК 16S) может также оказывать действие, как и расстояние и состав последовательности между SD и стартовым кодоном ATG. Потенциальная вторичная структура мРНК вокруг ATG является другим важным фактором; ATG должен находиться в «петле», а не быть заключенным в «стебле», тогда как обратная ситуация относится к SD. Таким образом, посредством модификации состава и длины IGS можно модифицировать силу инициации трансляции и, следовательно, уровень продуцирования тяжелой цепи. Кажется вероятным, что оптимальная скорость инициации трансляции должна достигаться для максимизации экспрессии тяжелой цепи конкретного модифицированного Fab. Например, с одним модифицированным Fab высокий уровень экспрессии может быть переносимым, но для другого модифицированного Fab с отличающейся аминокислотной последовательностью высокий уровень экспрессии может оказаться токсичным, возможно, вследствие отличающихся эффективностей секреции или укладки. По этой причине была сконструирована серия из четырех межгенных последовательностей (фигура 20), позволяющих эмпирически определить оптимум IGS для модифицированного на основе hTNF40 Fab. IGS1 и IGS2 имеют очень короткие межгенные последовательности (-1 и +1 соответственно), и можно ожидать, что они дают тесно сопряженную трансляцию; эти SD-

последовательности (подчеркнутые) являются слегка отличающимися. Данные две последовательности, наиболее вероятно, будут сообщать высокий уровень инициации трансляции. IGS3 и IGS4 имеют большее расстояние между стартовыми кодонами и стоп-кодонами (+13) и отличаются по составу их последовательности; IGS3 имеет «более сильную» SD-последовательность. Все последовательности исследовали в отношении вторичной структуры (с использованием программы m/fold) и «оптимизировали», насколько это возможно; однако, с тесным сопряжением трансляции данных двух цепей отсутствие диссоциации рибосомы означает, что мРНК может не быть «обнаженной», что предотвращает образование вторичной структуры.

#### 10 Клонирование вариантов IGS

IGS-кассеты, показанные на фигуре 20, имеют фланкирующие клонирующие сайты SacI и MunI. Они построены отжигом комплементарных олигонуклеотидных пар. Фрагмент вектора получали расщеплением pTTO (hTNF40) SacI и NotI, а фрагмент тяжелой цепи получали расщеплением pDNABEng1 (hTNF40H) MunI и NotI. Затем выполняли

15 трехступенчатые лигирования с использованием эквимольных количеств этих двух рестрикционных фрагментов и приблизительно 0,05 пмоль каждой отожденной олиго-кассеты. Это создавало четыре экспрессионных плазмиды pTTO (hTNF40 IGS-1), pTTO (hTNF40 IGS-2), pTTO (hTNF40 IGS-3), pTTO (hTNF40 IGS-4).

Анализ экспрессии во встряхиваемых колбах

20 Данные четыре плазмиды трансформировали в штамм E.coli W3110, вместе с исходной экспрессионной конструкцией, и затем анализировали на экспрессию во встряхиваемых колбах, как описано. Результаты типичного эксперимента показаны на фигуре 21. Различные межгенные последовательности сообщают различные профили экспрессии. IGS1 и IGS2 накапливают периплазматический, модифицированный Fab быстро с пиком

25 при 1 часе после индукции, после чего извлекаемый уровень падает. Указанный пик является более высоким и падает более резко для IGS1. Приведенные результаты согласуются с высоким уровнем синтеза, как ожидалось для тесного трансляционного сопряжения для данных конструкций. IGS1, очевидно, придает более высокий уровень экспрессии тяжелой цепи, чем это делает IGS2. В этом случае, кажется, что такой

30 высокий уровень экспрессии является плохо переносимым, так как периплазматические уровни экспрессии падают после 1-часового пика. Это видно на профиле роста IGS1-культуры (не показано), которая достигает максимума при 1-часовой пост-индукции перед падением, что предполагает смерть и лизис клеток. IGS3 накапливает модифицированный Fab более медленно, но достигает максимума при 2 часах после индукции с более высокой

35 величиной пика (325 нг/мл/OD), перед тем как уровни падают. Рост данной культуры продолжался до 3 часов после индукции и достигал более высокой биомассы при максимуме (не показано). Это согласуется с более низким уровнем синтеза тяжелой цепи. IGS4 накапливает материал при еще более медленной скорости и не может достигать высокого пика продуктивности других 3 конструкций. Все варианты IGS значительно

40 превосходят исходный вектор. Гипотеза, что различные последовательности IGS сообщают различные скорости инициации трансляции, поддерживается данными экспериментальными результатами. В отношении модифицированного на основе hTNF40 Fab, кажется, что высокая скорость инициации трансляции тяжелой цепи плохо переносится и, следовательно, не является оптимальной. Более медленная скорость,

45 такая как сообщаемая IGS3, приводит к лучшим характеристикам роста, и вследствие этого накапливается лучший выход на протяжении времени.

После сравнения продуктивности в ферментере конструкция IGS3 была выбрана как наиболее продуктивная и была названа pTTO(CDP870) - см. фигуру 22.

50 Тяжелая цепь, кодируемая плазмидой pTTO(CDP870), имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 115, а легкая цепь имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 113.

ПЭГилирование CDR-привитого, созданного на основе hTNF40 модифицированного Fab Очищенный модифицированный Fab конъюгируют сайт-специфически с разветвленной

молекулой ПЭГ. Это достигается активацией единственного остатка цистеина в укороченной шарнирной области модифицированного Fab с последующей реакцией с (ПЭГ)-лизилмалеимидом, как описано ранее (A.P.Chapman et al., Nature Biotechnology, 17, 780-783, 1999). ПЭГилированная молекула показана на фигуре 13, и она названа соединением CDP870.

Эффективность ПЭГилированного CDR-привитого, созданного на основе hTNF40 модифицированного Fab (CDP870) в лечении ревматоидного артрита CDP870 имеет продолжительный полупериод существования в организме приблизительно 11 дней.

Авторы оценивали безопасность и эффективность внутривенно вводимого CDP870 в рандомизированном двойко-слепом контролируемом плацебо испытании с увеличением дозы на пациентах с ревматоидным артритом (RA).

Способы

Пациенты

Пациенты в возрасте между 18 и 75 годами, которые удовлетворяли пересмотренным в 1987 году диагностическим критериям Американского Колледжа ревматологии (ACR) для ревматоидного артрита (RA) (Arnett et al., Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988), были набраны из амбулаторных больных ревматологических клиник в Лондоне, Кембридже, Норфольке и Норвиче (Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии). Требовалось, чтобы пациенты имели клинически активное заболевание, определяемое по наличию по меньшей мере 3 из следующих критериев:  $\geq 6$  болезненных или чувствительных при прикосновении суставов;  $\geq 45$  минут тугоподвижности рано утром и скорость оседания эритроцитов (ESR)  $\geq 28$  мм/ч. Они должны были быть неспособными отвечать на по меньшей мере одно модифицирующее заболевание противоревматическое лекарственное средство (DRARD) и не подвергаться лечению в течение по меньшей мере 4 недель. Кортикостероиды разрешались, если доза была  $\geq 7,5$  мг/день преднизолона. Беременные женщины, кормящие женщины и женщины, потенциально способные к деторождению, не использующие эффективного способа контрацепции, исключались из исследования. Пациенты исключались, если они имели предшествующую историю злокачественности, сопутствующие тяжелые медицинские состояния, предыдущую неудачу в TNF-нейтрализующей терапии или аллергию на полиэтиленгликоль. Письменное информированное согласие получали от каждого пациента перед внесением в списки для исследования. Исследование было одобрено местными комитетами по исследовательской этике.

Протокол лечения

36 пациентов с RA делили на 3 группы, причем каждая получала увеличивающуюся дозу испытуемого лекарственного средства (1, 5 или 20 мг/кг). Каждая группа из 12 пациентов была разделена на 8 пациентов для получения CDP870 и 4 пациента для получения плацебо. CDP870 предоставляли в виде единственной внутривенной инфузии (100 мл в целом) на протяжении 60 минут. Плацебо (натрий-ацетатный буфер) вводили подобным образом в виде единственной внутривенной инфузии 100 мл на протяжении 60 минут. Лечение проводили амбулаторно. Спустя 8 недель все пациенты имели возможность получать инфузию либо 5, либо 20 мг/кг CDP870 открытым образом (т.е. с уведомлением пациента о величине дозы).

Клиническая оценка

Заболевание ревматический артрит (RA) оценивали на основе наборов главных данных Всемирной организации здравоохранения и Международной Лиги Ассоциаций по Ревматологии (Boers et al., J. Rheumatol. - Supplement, 41, 86-89, 1994) и Европейской Лиги против ревматизма (EULAR) (Scott et al., Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) с числом суставов 28. Изменения в активности заболевания оценивали при помощи балльной оценки активности заболевания (Prevoo et al., Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) и критериев ACR-ответов (Felson et al., Arthritis Rheum., 38, 727-735, 1995). Оценки проводили перед лечением и при 1, 2, 4, 6 и 8 неделях после лечения.

Пациентов также оценивали в отношении безопасности и переносимости испытуемого лекарственного средства. Гематологию, биохимию, антитела против CDP870 и вредные явления оценивали при каждом визите.

Концентрация CDP870 в плазме и антитела против CDP870

5 CDP870 измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Серийные разведения плазмы пациентов инкубировали в микротитрационных планшетах (Nunc), покрытых рекомбинантным TNF $\alpha$  человека (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). Уловленные CDP870 обнаруживали конъюгированными с пероксидазой хрена козыими антителами против легкой цепи каппа человека (Cappel, ICN), с последующим субстратом  
10 тетраметилбензидином (TMB).

Антитела к CDP870 подвергали скринингу (при разведении плазмы 1/10) с использованием ELISA с двойным сэндвичем антигена с биотинилированным CDP870 в качестве второго слоя. Связанные антитела выявляли с использованием HRP-стрептавидина и субстрата TMB. Анализ калибровали с использованием стандарта IgG  
15 гипериммунного кролика. Единица активности эквивалентна 1 мкг кроличьего стандарта.

Статистический анализ

Это испытание было исследовательским по характеру и размер пробы был основан на предыдущем опыте с подобными агентами. Эффективность CDP870 анализировали при помощи расчета балльной оценки активности заболевания (DAS) и ACR20/50-ответных  
20 реакций с целью лечения и с использованием закрытой процедуры тестирования для каждого протокола. Балл активности заболевания рассчитывали следующим образом: DAS=0,555 $\times$ квадратный корень из (28 болезненных суставов)+0,284 $\times$ квадратный корень из (28 распухших суставов)+0,7 $\times$ ln(ESR)+0,0142 $\times$ (глобальная оценка пациента). Сначала объединенные активные группы сравнивали с плацебо. Если это сравнение было  
25 значимым при 5% уровне, каждую группу доз сравнивали с плацебо. Все сравнения имели двустороннее распределение с уровнем достоверности 5%. Все величины P были получены из исследовательского анализа и не должны быть использованы для интерпретации с окончательными выводами.

Результаты

30 Демография

Были зарегистрированы 36 пациентов с RA. Их демографические детали приведены в таблице 6. Средний возраст был 56 лет и 30 пациентов были женщинами. Средняя продолжительность RA была 13 лет, и 21 пациент имели положительный ревматоидный фактор. Пациенты в различных группах имеют сходные демографические характеристики.  
35 В периоде слепого введения доз 6/12 получавших плацебо пациентов вышли из испытания из-за ухудшения RA в момент  $\geq 4$  недель после введения доз. 2/24 получавших CDP870 пациентов вышли из испытания, оба в группе 1 мг/кг, из-за ухудшения RA/отсутствия возможности проверки результатов испытания в момент  $>4$  недель после введения доз. Различие было статистически значимым (p=0,009, точный тест Фишера).

40

Таблица 6 Демографические детали (среднее $\pm$ стандартное отклонение)						
	Число	Пол (М:Ж)	Возраст	Продолжительность болезни	Ревматоидный фактор	Число предыдущих DMAJRD
Плацебо	12	1:11	51 $\pm$ 8	12 $\pm$ 8	8 (67%)	5 $\pm$ 1
1 мг/кг	8	1:7	59 $\pm$ 7	12 $\pm$ 7	4 (50%)	4 $\pm$ 1
5 мг/кг	8	2:6	54 $\pm$ 13	13 $\pm$ 5	5 (63%)	5 $\pm$ 2
20 мг/кг	8	2:6	61 $\pm$ 11	14 $\pm$ 13	4 (50%)	4 $\pm$ 2

45

Клиническая эффективность

Доля пациентов с улучшением ACR20 для популяции согласно протоколу с последним наблюдением, свидетельствующим об улучшении, была 16,7, 50, 87,5 и 62,5% после  
50 плацебо, 1, 5 и 20 мг/кг CDP870 (p=0,012 эффекта объединенной обработки) при 4 неделях и 16,7, 25, 75 и 75% (p=0,032) при 8 неделях. Снижение оценок DAS (медианы) для популяции согласно протоколу с последним наблюдением, свидетельствующим об улучшении, было 0,15, 1,14, 1,91 и 1,95 после плацебо, 1, 5 и 20 мг/кг CDP870 (p=



0,001 эффекта объединенной обработки) при 4 неделях и 0,31, 0,09, 2,09 и 1,76 ( $p=0,008$ ) при 8 неделях (фигура 23).

Изменения в индивидуальных компонентах набора главных данных Всемирной организации здравоохранения и Международной Лиги Ассоциаций по Ревматологии показаны на фигуре 24.

После раскрытой для пациентов дозы CDP870 были получены аналогичные благоприятные эффекты. Из 36 пациентов, набранных в это испытание, 32 получили вторую инфузию CDP870. Доля пациентов с улучшением ACR20 из предыдущей первой инфузии была 72,2 и 55,6% после 5 и 20 мг/кг CDP870 при 4 неделях и 55,6 и 66,7% при 8 неделях.

#### Побочные эффекты

Лечение хорошо переносилось без связанной с инфузией реакции. Не сообщалась аллергическая реакция или кожная сыпь. В двояко-слепой фазе были 19, 38, 8 и 14 побочных действий в группах плацебо, 1, 5 и 20 мг/кг соответственно. Самым общим явлением была головная боль с 9 случаями у 5 пациентов (1 плацебо, 3 при 1 мг/кг, 1 при 20 мг/кг). Один пациент, который получал плацебо, и 3 пациента, которые получали CDP870 (1 при 5 мг/кг и 2 при 20 мг/кг), развивали инфекции нижних дыхательных путей. Они сообщались как слабые или умеренные. Их лечили перорально антибиотиками, и они проходили на протяжении периода 1-2 недель. Три пациента, каждый в группах 1 и 5 мг/кг и один в группе 20 мг/кг, имели инфекцию мочевых путей спустя 1-2 месяца после лечения CDP870. Одно неблагоприятное событие было описано как тяжелое, которое было случаем боли в области шеи, появившейся спустя 3 дня после инфузии 1 мг/кг. Увеличение антинуклеарных антител наблюдали у 4 пациентов: 1 в группе плацебо (отрицательные в отношении 1/40), 2 в группе 1 мг/кг (отрицательные в отношении 1/40, отрицательные в отношении 1/80) и 1 в группе 20 мг/кг (отрицательные в отношении 1/40). Не было обнаружено изменение в антителах против ДНК или антителах против кардиолипина.

#### Концентрация CDP870 в плазме и уровни анти-CDP870

Как и ожидалось, для всех уровней доз CDP870 максимальная концентрация в плазме наблюдалась в конце инфузии и она была пропорциональна дозе, после чего концентрация в плазме медленно снижалась. Профиль концентрации CDP870 в плазме кажется очень похожим на профиль, наблюдаемый ранее у волонтеров, когда было рассчитано, что биологический период полураспада был приблизительно 14 дней. При повторном введении доз наблюдали аналогичный профиль по сравнению с инфузией единственной дозы.

После единственного внутривенного вливания уровни антител против CDP870 были низкими или недетектируемыми.

#### Обсуждение

Нейтрализация  $TNF\alpha$  является эффективной стратегией лечения в случае ревматоидного артрита (РА). В настоящее время она требует применения биологических агентов, таких как химерные mAb или растворимый слитый белок рецептор/Fc человека, которые являются дорогостоящими в приготовлении. Терапевтический нейтрализующий  $TNF\alpha$  агент должен связывать  $TNF\alpha$  с высокой аффинностью и иметь продолжительный период полураспада в плазме, низкую антигенность и высокую переносимость и безопасность. Он должен быть также доступным для всех пациентов с РА, которые могли бы получить пользу от блокады  $TNF\alpha$ . Одной технологией, которая могла бы достичь этих целей, является конъюгирование с полиэтиленгликолем  $TNF\alpha$ -связывающего фрагмента антитела, образованного в *E.coli*. В данном предварительном исследовании авторы нашли, что CDP870, ПЭГилированный, направленный против  $TNF\alpha$ , модифицированный Fab, является эффективным и хорошо переносимым пациентами с РА.

Исследования *in vitro* показали, что CDP870 имеет аналогичную  $TNF\alpha$  нейтрализующую активность относительно мышинового исходного антитела против  $TNF\alpha$ . Данное исследование подтверждает, что CDP870 уменьшал воспаление и улучшал симптомы в РА. Клиническое улучшение, измеренное посредством критериев ACP20-ответных реакций в

группах 5 и 20 мг/кг (75%, 75%), было сравнимо с этанерцептом (60%) (Moreland et al., Annals Int. Med., 130, 478-486, 1999) и инфликсимабом (50%) (Maini et al., Lancet, 354, 1932-1939, 1999). При среднем и наивысшем уровнях испытанных доз терапевтический эффект длился 8 недель, что сравнимо с предыдущими другими mAb (Elliot et al., Lancet, 344, 1105-1110, 1994 и Rankin et al., Br. J. Rheumatol., 34, 334-342, 1995). Более раннее исследование показало, что терапевтический эффект антитела против TNF $\alpha$  связан с его периодом полураспада в плазме и образованием циркулирующих антител (Maini et al., Arthritis Rheum. 38, (Supplement): S186 1995 (Abstract)). Исследование авторов показало, что CDP870 имеет полупериод существования в плазме 14 дней, что эквивалентно полупериоду существования целого антитела (Rankin et al., (supra)) и гораздо больше, чем полупериод существования не конъюгированных Fab'-фрагментов. Кроме того, CDP870 генерировал лишь очень низкие уровни ответной реакции в виде образования антител.

Одной из важных целей данного изобретения является исследование переносимости и безопасности введения этого ПЭГилированного Fab'. В исследовании авторов CDP870, по-видимому, хорошо переносился. Хотя необходимо дополнительное исследование для оценки долгосрочной токсичности, особенно риска демиелинизирующего заболевания, инфекции и кожных высыпаний, которые сообщались для этанерцепта и инфликсимаба.

В целом, CDP870 является терапевтически эффективным в RA и был хорошо переносимым в этом краткосрочном исследовании.

Должно быть понятно, что описанные выше примеры являются лишь иллюстративными и не ограничивают объем данного изобретения, определенный следующей формулой изобретения.

25

30

35

40

45

50

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 5 <213> Синтетическая последовательность

<220>  
 <223> Описание синтетической последовательности: CDRH3 hTNF40  
 10

<400> 3  
 Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5  
 15

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 20 <213> Синтетическая последовательность

<220>  
 <223> Описание синтетической последовательности: hTNF40 CDRL1  
 25

<400> 4  
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
 1 5 10  
 30

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Синтетическая последовательность  
 35

<220>  
 <223> Описание синтетической последовательности: hTNF40 CDRL2

40 <400> 5  
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
 1 5

45 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Синтетическая последовательность  
 50

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: hTNF40 CDRL3

5 <400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

10 <210> 7

<211> 17

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

15

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: hTNF40 CDRH2

20 <400> 7

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

Gly

25

<210> 8

<211> 321

30 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)..(321)

<220>

40 <223> Описание синтетической последовательности: hTNF40-gL1

<400> 8

45 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

50

```

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

10 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
15                100                105

<210> 9
<211> 321
<212> ДНК
20 <213> Синтетическая последовательность

<220>
<221> CDS
25 <222> (1).. (321)

<220>
30 <223> Описание синтетической последовательности: hTNF40-gL2

<400> 9

gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc ctg agc gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1                5                10                15

gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
40                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
45                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

50

```

```

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
5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100                      105

<210> 10
<211> 354
10 <212> ДНК
    <213> Синтетическая последовательность

<220>
15 <221> CDS
    <222> (1).. (354)

<220>
20 <223> Описание синтетической последовательности: ghIhTNF40.4
    (фигура 10)

<400> 10
25
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
30 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
35 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
      50                      55                      60

cag ggc aga gtc acg ttc act cta gac acc tcc aca agc act gca tac 240
40 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 tet tat gcc atg gac tac tgg ggc cag ggt acc 336
45 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
50

```

<210> 11

<211> 354

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (354)

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: gh3hTNF40.4

15 (фигура 11)

<400> 11

20	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	
25	gga atg aat tgg gtt aga cag gcc ccg gga aag ggc ctg gaa tgg atg	144
	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	ggt tgg att aat act tac att gga gag cct att tat gct gac agc gtc	192
	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val	
30	50 55 60	
	aag ggc aga ttc acg ttc tct cta gac aca tcc aag tca aca gca tac	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
35	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
40	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	

45

<210> 12

<211> 9

<212> ДНК

50

<213> Синтетическая последовательность

<220>

5 <223> Описание синтетической последовательности: часть последовательности праймера

<400> 12

10 **gcccgcacc** 9

<210> 13

<211> 26

15 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

20 <223> Описание синтетической последовательности: праймер СН1

<400> 13

**atgaaatgca gctgggtcat sttctt** 26

25 <210> 14

<211> 26

<212> ДНК

30 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер СН2

35 <400> 14

**atgggatgga gctrtatcat sytctt** 26

40 <210> 15

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

45 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер СН3

<400> 15

50



**atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt** 26

<210> 16

<211> 21

5 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

10 <223> Описание синтетической последовательности: праймер СН4

<400> 16

15 **atgractttg ggytcagctt grt** 23

<210> 17

<211> 26

20 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

25 <223> Описание синтетической последовательности: праймер СН5

<400> 17

**atggactcca ggctcaattt agtttt** 26

30 <210> 18

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

35 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер СН6

<400> 18

40 **atggctgtcy trgsctrct cttctg** 26

<210> 19

<211> 25

45 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

50

<223> Описание синтетической последовательности: праймер SN7  
 <400> 19  
 5 **atggratgga gckggrtctt tmtott** 25  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 10 <213> Синтетическая последовательность  
 <220> 20  
 <223> Описание синтетической последовательности: праймер SN8  
 15 <400> 20  
**atgagagtgc tgattctttt gtg** 23  
 20 <210> 21  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Синтетическая последовательность  
 25 <220>  
 <223> Описание синтетической последовательности: праймер SN9  
 30 <400> 21  
**atggmttggg tgtggamctt gctatt** 26  
 <210> 22  
 35 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Синтетическая последовательность  
 40 <220>  
 <223> Описание синтетической последовательности: праймер SN10  
 <400> 22  
 45 **atgggcagac ttacattctc attcct** 26  
 <210> 23  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 50

<213> Синтетическая последовательность

<220>

5 <223> Описание синтетической последовательности: праймер SN11

<400> 23

**atggattttg ggctgatttt ttttattg** 28

10 <210> 24

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

15

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер SN12

20 <400> 24

**atgatggtgt taagtcttct gtacct** 26

<210> 25

25 <211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

30

<223> Описание синтетической последовательности: 5'-конец праймера

<400> 25

35

**gcgcgcaagc ttgccgccac c** 21

<210> 26

40 <211> 29

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

45

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL1

<400> 26

**atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct** 29

50

<210> 27

<211> 29

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL2

10

**<400> 27**

**atggagwca g acacactcct gytatgggt 29**

<210> 28

15

<211> 23

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

20

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL3

<400> 28

25

**atgagtgtgc tcactcaggt cct 23**

<210> 29

<211> 26

30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

35

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL4

<400> 29

**atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26**

40

<210> 30

<211> 29

<212> ДНК

45

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL5

50

	<400> 30		
	<b>atggatttwc aggtgcagat twtcagctt</b>		<b>29</b>
5	<210> 31		
	<211> 29		
	<212> ДНК		
	<213> Синтетическая последовательность		
10	<220>		
	<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL5A		
15	<400> 31		
	<b>atggatttwc argtgcagat twtcagctt</b>		<b>29</b>
	<210> 32		
20	<211> 26		
	<212> ДНК		
	<213> Синтетическая последовательность		
25	<220>		
	<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL6		
	<400> 32		
30	<b>atgaggtkcy ytgysagyt yctgrg</b>		<b>26</b>
	<210> 33		
	<211> 23		
35	<212> ДНК		
	<213> Синтетическая последовательность		
	<220>		
40	<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL7		
	<400> 33		
	<b>atgggcwtca agatggagtc aca</b>		<b>23</b>
45	<210> 34		
	<211> 29		
	<212> ДНК		
	<213> Синтетическая последовательность		
50			

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL8

5 <400> 34

**atgtggggay ctkttttymm tttttcaat** 29

<210> 35

10 <211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

15 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL9

<400> 35

20 **atggtrtccw casctcagtt cctt** 24

<210> 36

<211> 26

25 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

30 <223> Описание синтетической последовательности: праймер CL10

<400> 36

**atgtatatat gtttgttgtc tatttc** 26

35

<210> 37

<211> 26

<212> ДНК

40 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL11

45

<400> 37

**atggaagccc cagctcagct tctctt** 26

<210> 38

50

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

5

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL12A

10

<400> 38

**atgragtywc agaccaggt cttyr**

26

<210> 39

15

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

20

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL12B

<400> 39

25

**atggagacac attctcaggt ctttgt**

26

<210> 40

<211> 26

30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

35

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL13

<400> 40

**atggattcac aggccaggt tcttat**

26

40

<210> 41

<211> 26

<212> ДНК

45

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL14

50

&lt;400&gt; 41

**atgatgagtc ctgcccagtt cctggt**

26

5 &lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Синтетическая последовательность

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание синтетической последовательности: праймер CL15

15 &lt;400&gt; 42

**atgaatttgc ctgttcatct cttgggtgct**

29

&lt;210&gt; 43

20 &lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Синтетическая последовательность

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание синтетической последовательности: праймер CL16

&lt;400&gt; 43

30 **atggattttc aattggctct catctcctt**

29

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 26

35 &lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Синтетическая последовательность

&lt;220&gt;

40 &lt;223&gt; Описание синтетической последовательности: праймер CL17A

&lt;400&gt; 44

**atgaggtgcc tarcttsagtt cctgrg**

26

45

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; ДНК

50



<213> Синтетическая последовательность

<220>

5 <223> Описание синтетической последовательности: праймер CL17B

<400> 45

**atgaagtact ctgctcagtt tctagg** 26

10 <210> 46

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

15

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL17C

20 <400> 46

**atgaggcatt ctcttcaatt cttggg** 26

<210> 47

25 <211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

30 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: 5'-конец праймера

<400> 47

35

**ggactgttcg aagccgccac c** 21

<210> 48

40 <211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

45

<223> Описание синтетической последовательности: праймер CL12

<400> 48

**ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt** 30

50

<210> 49

<211> 37

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер R2155

10

<400> 49

**gcagatgggc ccttcggtga ggctgmrqag acdgtga**

**37**

15

<210> 50

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

20

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер R1053

25

<400> 50

**gctgacagac taacagactg ttcc**

**24**

<210> 51

30

<211> 18

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

35

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер R720

<400> 51

40

**gctctcggag gtgctcct**

**18**

<210> 52

<211> 70

45

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

50

<223> Описание синтетической последовательности:  
 олигонуклеотид P7982

5 <400> 52  
 gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg 60  
 tatcagcaaa 70

10 <210> 53  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Синтетическая последовательность

15 <220>  
 <223> Описание синтетической последовательности:  
 олигонуклеотид P7983

20 <400> 53  
 atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctgggt tttgctgata 60  
 ccaggctacg t 71

25 <210> 54  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Синтетическая последовательность

30 <220>  
 <223> Описание синтетической последовательности:  
 олигонуклеотид P7984

35 <400> 54  
 tacagtgcct ctttcctcta tagtgggtga ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggt 60  
 actgatttca c 71

40 <210> 55  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Синтетическая последовательность

45 <220>  
 <223> Описание синтетической последовательности:  
 олигонуклеотид P7985

50

<400> 55

gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60  
taccactacc g 71

5

<210> 56

<211> 89

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

10

<220>

<223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид P7986

15

<400> 56

atttcgccc ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacatc ggtcagggta 60  
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

20

<210> 57

<211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

25

<220>

<223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид P7981

30

<400> 57

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

35

<210> 58

<211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

40

<220>

<223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид P7980

45

<400> 58

gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

50

<210> 59

<211> 24

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

10 <223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид R1053

<400> 59

15 **gctgacagac taacagactg ttcc** 24

<210> 60

<211> 57

<212> ДНК

20 <213> Синтетическая последовательность

<220>

25 <223> Описание синтетической последовательности: олигонуклеотид  
R5350

<400> 60

30 **tctagatggc acaccatctg etaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc** 57

<210> 61

<211> 59

<212> ДНК

35 <213> Синтетическая последовательность

<220>

40 <223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид R5349

<400> 61

45 **gcagatggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac** 59

<210> 62

<211> 18

<212> ДНК

50

<213> Синтетическая последовательность

<220>

5 <223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотид R684

<400> 62

10 **ttcaactgct catcagat** 18

<210> 63

<211> 65

15 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

20 <223> Описание синтетической последовательности: праймер P7989

<400> 63

**gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg** 60  
**aattc** 65

25

<210> 64

<211> 71

<212> ДНК

30

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7990

35

<400> 64

**ggttaagaag cctggtgctt ccgtcaaagt ttcgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac** 60  
**agactatggt a** 71

40

<210> 65

<211> 71

<212> ДНК

45

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7991

50

<400> 65

ccaaccatc catttcaggc cttgtcccgg ggcctgcttg acccaattca taccatagtc 60  
tgtgaacacg t 71

5

<210> 66

<211> 81

<212> ДНК

10 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7995

15

<400> 66

ggcctgaaat ggatggggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60  
ttcaagggca gattcacgtt c 81

20

<210> 67

<211> 56

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

25

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7992

<400> 67

30

ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtot agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

35

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

40

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7993

<400> 68

ccaacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cggggacacc gcagtgtact 60  
at 62

45

<210> 69

<211> 78

<212> ДНК

50

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7994

5

<400> 69

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

10

<210> 70

<211> 30

<212> ДНК

15

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7988

20

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

25

<210> 71

<211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

30

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7987

35

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

<210> 72

<211> 65

40

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

45

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7999

<400> 72

gatccgccaag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60  
aattc 65

50



<210> 73

<211> 71

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P8000

10

<400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtctgtgct gcctctggtt acgtcttcaac 60  
agactatgga a 71

15

<210> 74

<211> 71

<212> ДНК

20 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P8001

25

<400> 74

ccaaccatc catttcaggc cctttcccgg ggctgtgcta acccaattca ttccatagtc 60  
tgtgaagacg t 71

30

<210> 75

<211> 55

<212> ДНК

35 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7997

40

<400> 75

ggaggtatgc tgttgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76

45

<211> 62

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

50

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7998

5 <400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60  
at 62

<210> 77

10 <211> 78

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

15 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: праймер P7993

<400> 77

20 gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 78

25 <211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

30 <223> Описание синтетической последовательности: праймер P7996

<400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

35

<210> 79

<211> 74

<212> ДНК

40 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: 5'-праймер

45 <400> 79

cgcgcgгcaа ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcgaagc tgacattcaa 60  
atgaccсага gccc 74

<210> 80

50

<211> 20

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

5

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: 3'-праймер

10 <400> 80

**ttcaactgct catcagatgg**

20

<210> 81

15 <211> 78

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

20 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: 5'-праймер

<400> 81

25

**gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttcgccaccg tggcgcgaagc tgaggttcag 60**  
**ctggtcgagt caggaggc 78**

<210> 82

<211> 18

30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

35

<223> Описание синтетической последовательности: 3'-праймер

<400> 82

**gcctgagttc cacgacac**

18

40 <210> 83

<211> 23

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

45

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L1  
 консенсуса группы 1 человека

50

<400> 83

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

5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 84

<211> 23

10 <212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

<220>

15 <223> Описание синтетической последовательности: каркасная область L1 hTNF40

<400> 84

20 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

25 <210> 85

<211> 15

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

30

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L2 консенсуса группы 1 человека

35

<400> 85

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

40 <210> 86

<211> 15

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

45

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L2 hTNF40

50

<400> 86

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

5 <210> 87

<211> 32

<212> Белок

10 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L3  
 15 консенсуса группы 1 человека

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 32

25 <212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

<220>

30 <223> Описание синтетической последовательности: каркас L3  
 hTNF40

<400> 88

35 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser 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

40 <210> 89

<211> 11

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

45

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L4  
 консенсуса группы 1 человека

50

<400> 89

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

5

<210> 90

<211> 11

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

10

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас L4  
 hTNF40

15

<400> 90

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

20

<210> 91

<211> 30

<212> Белок

25

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H1  
 консенсуса группы 1 человека

30

<400> 91

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

35

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

<210> 92

<211> 30

40

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

<220>

45

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H1  
 hTNF40

<400> 92

50

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

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

5

<210> 93

<211> 14

<212> Белок

10

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H2

15

консенсуса группы 1 человека

<400> 93

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

20

<210> 94

<211> 14

<212> Белок

25

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H2

30

hTNF40

<400> 94

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

35

<210> 95

<211> 32

<212> Белок

40

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H3

45

консенсуса группы 1 человека

<400> 95

50

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

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

5

<210> 96

<211> 32

10

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

<220>

15

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H3  
 hTNF40

<400> 96

20

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

25

<210> 97

<211> 11

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

30

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H4  
 консенсуса группы 1 человека

35

<400> 97

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

40

<210> 98

<211> 11

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

45

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H4  
 hTNF40

50



<400> 98

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

5 <210> 99

<211> 324

<212> ДНК

10 <213> мышинная

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(324)

<223> вариабельный домен легкой цепи мышиноного hTNF40

<400> 99

20 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

25 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

30 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

35 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

40 <210> 100

<211> 354

<212> ДНК

45 <213> мышинная

<220>

<221> CDS

50

<222> (1)..(354)

<223> вариабельный домен тяжелой цепи мышиноного hTNF40

<400> 100

```

5   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

10  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

15  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

15  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

20  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

20  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

25  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

```

30

<210> 101

<211> 84

<212> ДНК

35 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<221> CDS

40 <222> (29)..(67)

<223> Описание синтетической последовательности:  
олигонуклеотидный адаптер OmpA

45

<400> 101

```

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

```

50

gca gtg gcc ttg gct ctgacgtacg agtcagg

84

Ala Val Ala Leu Ala

10

<210> 102

5

<211> 67

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

10

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(40)

15

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(66)

20

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: IGS-кассета-1

<400> 102

25

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

Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Xaa	Xaa	Lys
1				5				10					15	

aag act gct ata gca att g

67

30

Lys Thr Ala Ile Ala Ile

20

<210> 103

<211> 69

35

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

40

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

45

<221> CDS

<222> (45)..(68)

<220>

50

<223> Описание синтетической последовательности: IGS-кассета-2

<400> 103

5 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

10

<210> 104

<211> 81

<212> ДНК

15 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<221> CDS

20 <222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

25 <222> (57)..(80)

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: IGS-кассета-3

30

<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

35

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

<210> 105

<211> 81

40

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

45

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

50

<221> CDS

<222> (57)..(80)

5 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: IGS-кассета-4

<400> 105

10 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

15 <210> 106

<211> 30

<212> Белок

20 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H1  
 25 консенсуса группы 3 человека

<400> 106

30 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

35 <211> 13

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

40 <220>

<223> Описание синтетической последовательности: каркас H2  
 консенсуса группы 3 человека

45 <400> 107

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

50

<210> 108

<211> 32

<212> Белок

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

10 <223> Описание синтетической последовательности: каркас H3  
консенсуса группы 3 человека

<400> 108

15 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

20 <210> 109

<211> 11

<212> Белок

25 <213> Синтетическая последовательность

<220>

30 <223> Описание синтетической последовательности: каркас H4  
консенсуса группы 3 человека

<400> 109

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

<210> 110

<211> 648

<212> ДНК

40 <213> Синтетическая последовательность

<220>

45 <223> Привитая тяжелая цепь для Fab

<400> 110

50

gaggttcagc tggctcagtc aggaggcggg ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60  
 tcctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120  
 ccgggaagg gectggaatg gatgggttgg attaatactt acatiggaga gcctatttat 180  
 gctgacagcg tcaagggcag attcaagttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240  
 ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtggt actattgtgc tagaggatac 300  
 5 agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagttct ctcagcttcc 360  
 accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420  
 gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttcccogaac cgggtgacggt gtcgtggaac 480  
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540  
 tactcctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggctcgaca agaaagtt 648

10

<210> 111

<211> 216

<212> Белок

15

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Привитая тяжелая цепь для Fab

20

<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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 45 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

50

<210> 112

<211> 642

<212> ДНК

5 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Привитая легкая цепь для Fab и модифицированного Fab

10 <400> 112

```

gacattcaaa tgacccagag cccatccagc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggt actaacgtag cctgggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaaagccc caaaagccct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
15 aggttcagcg gatccggtag tggtaactgat ttcaccctca cgatcagtag cctccagcca 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccactcac attcggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
20 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcaac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642
    
```

<210> 113

<211> 214

<212> Белок

25 <213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Привитая легкая цепь для Fab и модифицированного Fab

30 <400> 113

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
35 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
40 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
45 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
    
```

50



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> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Привитая тяжелая цепь для модифицированного Fab

<400> 114

gaggttcagc	tggtcgagtc	aggaggcgg	ctcgtgcagc	ctggcggatc	actgagattg	60
tctgtgctg	catctggtta	cgtcttcaca	gactatggaa	tgaattgggt	tagacaggcc	120
ccgggaaagg	gcctggaatg	gatgggttg	attaataactt	acattggaga	gcctatztat	180
gctgacagcg	tcaagggcag	attcacgttc	tctctagaca	catccaagtc	aacagcatac	240
ctccaaatga	atagcctgag	agcagaggac	accgcagtgt	actattgtgc	tagaggatac	300
agatcttatg	ccatggacta	ctggggccag	ggtaccctag	tcacagtctc	ctcagcttcc	360
accaagggcc	catcggtctt	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcgccctgg	gctgcctggt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggg	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttccccgctg	tcttcagtc	ctcaggactc	540
tactcctca	gcagcgtggt	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtcgaca	agaaagttga	gccccaatct	660
tgtagacaaa	ctcacacatg	cgccgcg				687

<210> 115

<211> 229

<212> Белок

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Привитая тяжелая цепь для модифицированного Fab

<400> 115

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 10 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 25 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 30 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 35 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 40 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 45 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 50 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 55 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 60 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 65 His Thr Cys Ala Ala  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225

40

## Формула изобретения

1. Молекула антитела, специфичная к  $TNF_{\alpha}$  человека, содержащая тяжелую и легкую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит CDR-участки с последовательностью SEQ ID NO: 1 для CDRH1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7 для CDRH2 и SEQ ID NO: 3 для CDRH3, а переменный домен легкой цепи содержит CDR-участки с последовательностью SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 5 для CDRL2 и SEQ ID NO: 6 для CDRL3, и, необязательно, являющаяся модифицированным Fab-фрагментом, на С-конце тяжелой цепи которого присутствует одна или несколько аминокислот для возможности присоединения эффекторной или репортерной молекулы.
2. Молекула антитела по п.1, которая содержит SEQ ID NO: 2 для CDRH2.
3. Молекула антитела по п.1 или 2, которая является CDR-привитой молекулой антитела.
4. Молекула антитела по п.3, где переменный домен содержит акцепторные каркасные

области человека и донорные CDR, не являющиеся человеческими.

5 5. Молекула антитела по п.4, где акцепторные каркасные области человека переменного домена тяжелой цепи основаны на консенсусной последовательности группы 1 человека и содержат донорные остатки, не являющиеся человеческими, в положениях 28, 69 и 71.

6. Молекула антитела по п.4, где акцепторные каркасные области человека переменного домена тяжелой цепи основаны на консенсусной последовательности группы 1 человека и содержат донорные остатки, не являющиеся человеческими, в положениях 28, 38, 46, 67, 69 и 71.

10 7. Молекула антитела по п.4, где акцепторные каркасные области человека переменного домена тяжелой цепи основаны на консенсусной последовательности группы 3 человека и содержат донорные остатки, не являющиеся человеческими, в положениях 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 и 78.

15 8. Молекула антитела по любому из пп.4-7, где акцепторные каркасные области человека переменного домена легкой цепи основаны на консенсусной последовательности группы 1 человека и содержат донорные остатки, не являющиеся человеческими, в положениях 46 и 60.

20 9. Молекула антитела по любому из пп.1-8, содержащая переменную область легкой цепи hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) и переменную область тяжелой цепи gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11).

10. Молекула антитела по любому из пп.1-9, которая является Fab-фрагментом.

11. Молекула антитела по п.9 или 10, которая является Fab-фрагментом, содержащим тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 111, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 113.

25 12. Молекула антитела по любому из пп.1-9, которая является модифицированным Fab-фрагментом, на С-конце тяжелой цепи которого присутствует одна или несколько аминокислот для возможности присоединения эффекторной или репортерной молекулы.

30 13. Молекула антитела по п.12, где дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или два остатка цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная или репортерная молекула.

14. Молекула антитела по п.13, которая является модифицированным Fab-фрагментом, содержащим тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 115 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 113.

35 15. Молекула антитела, специфичная к TNF $\alpha$  человека, легкая цепь которой содержит последовательность SEQ ID NO: 113.

16. Молекула антитела по п.15, легкая цепь которой состоит из последовательности SEQ ID NO: 113.

17. Молекула антитела, специфичная к TNF $\alpha$  человека, тяжелая цепь которой содержит последовательность SEQ ID NO: 115.

40 18. Молекула антитела по п.17, тяжелая цепь которой состоит из последовательности SEQ ID NO: 115.

19. Молекула антитела, специфичная к TNF $\alpha$  человека, легкая цепь которой содержит последовательность SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которой содержит последовательность SEQ ID NO: 115.

45 20. Молекула антитела по п.19, легкая цепь которой состоит из последовательности SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которой состоит из последовательности SEQ ID NO: 115.

21. Молекула антитела по любому из пп.1-20, аффинность которой в отношении TNF $\alpha$  составляет по меньшей мере  $0,85 \cdot 10^{-10}$  М.

50 22. Молекула антитела по п.21, которая получена по протоколу достижения аффинности.

23. Молекула антитела по п.1, которая является мышинным моноклональным антителом hTNF40 против TNF $\alpha$ .

24. Молекула антитела по п.1, которая является химерной молекулой антитела, содержащей переменные домены легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела по

п.23.

25. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$ , содержащее молекулу антитела по любому из пп.12-20 с ковалентно присоединенной к аминокислоте на С-конце или в направлении С-конца ее тяжелой цепи эффекторной или репортерной молекулой, где эффекторная или репортерная молекула представляет собой одну или несколько молекул метоксиполи (этиленгликоля).

26. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$ , содержащее молекулу антитела по п.14 с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

27. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$ , содержащее специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека молекулу антитела, легкая цепь которого содержит последовательность SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которой содержит последовательность SEQ ID NO: 115, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи одной или несколькими молекулами метоксиполи (этиленгликоля).

28. Соединение по п.27, содержащее молекулу антитела, специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека, легкая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 115, с присоединенным к одному из остатков цистеина на С-конце стороне тяжелой цепи одним или несколькими молекулами метоксиполи (этиленгликоля).

29. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$ , содержащее специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека молекулу антитела, легкая цепь которого содержит последовательность SEQ ID NO: 113, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

30. Соединение по п.29, содержащее молекулу антитела, специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека, легкая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 113, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

31. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$  человека, содержащее специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека молекулу антитела, тяжелая цепь которого содержит последовательность SEQ ID NO: 115, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

32. Соединение по п.31, содержащее молекулу антитела, специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека, тяжелая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 115, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-концевой стороне тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

33. Соединение с аффинностью в отношении  $TNF_{\alpha}$  человека, содержащее специфичную к  $TNF_{\alpha}$  человека молекулу антитела, легкая цепь которого содержит последовательность SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которого содержит последовательность SEQ ID NO: 115, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

34. Соединение по п.33, содержащее молекулу антитела, специфичную в отношении  $TNF_{\alpha}$  человека, легкая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 113, и тяжелая цепь которого состоит из последовательности SEQ ID NO: 115, с присоединенной к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи лизилмалеимидной группой, где  
5 каждая аминокислотная группа лизильного остатка ковалентно связана с остатком метоксиполи (этиленгликоля) с молекулярной массой, равной приблизительно 20000 Да.

35. Молекула антитела по любому из пп.1-24, содержащая гибридный CDR, содержащий укороченную донорную последовательность CDR, где отсутствующая часть донорного CDR заменена отличающейся последовательностью и образует функциональный CDR.

10 36. Молекула антитела по п.35, где отсутствующая часть последовательности CDR является частью антитела, из которого получены каркасные области молекулы антитела.

37. Молекула антитела по п.36, где отсутствующая часть последовательности CDR является частью антитела зародышевой линии с консенсусными каркасными областями.

38. Молекула антитела по любому из пп.35-37, где в молекуле антитела участок CDRH2  
15 тяжелой цепи является гибридным.

39. Молекула антитела по любому из пп.35-38, где указанное укорочение сделано на С-конце CDR.

40. Последовательность ДНК, которая кодирует тяжелую и легкую цепь молекулы антитела по любому из пп.1-24 и 35-39, где молекула антитела специфична к  $TNF_{\alpha}$   
20 человека.

41. Последовательность ДНК, которая кодирует тяжелую цепь молекулы антитела по любому из пп.1-24 и 35-39, где молекула антитела специфична к  $TNF_{\alpha}$  человека.

42. Последовательность ДНК, которая кодирует легкую цепь молекулы антитела по любому из пп.1-24 и 35-39, где молекула антитела специфична к  $TNF_{\alpha}$  человека.

25 43. Последовательность ДНК по п.40 или 42, содержащая последовательность SEQ ID NO: 8 или 10.

44. Последовательность ДНК по п.40 или 41, содержащая последовательность SEQ ID NO: 10 или 11.

30 45. Последовательность ДНК по п.40, содержащая последовательность SEQ ID NO: 110, 112 или 114.

46. Вектор экспрессии, содержащий ДНК-последовательность по любому из пп.40-45.

47. Вектор экспрессии *E.coli*, содержащий ДНК-последовательность по любому из пп.40-45.

48. Вектор экспрессии *E.coli* по п.47, который представляет собой рТТО (CDP870).

35 49. Способ получения клетки-хозяина, предусматривающий трансформирование клетки вектором по пп.46-48.

50. Способ получения молекулы антитела по любому из пп.1-24 и 35-39, предусматривающий культивирование клетки-хозяина, полученной способом по п.49, и выделение молекулы антитела.

40 51. Способ по п.50, в котором клеткой-хозяином является *E.coli*.

52. Способ по п.51, в котором молекула антитела нацелена на периплазму.

53. Терапевтическая композиция, содержащая эффективное количество молекулы антитела по любому из пп.1-24 или 35-39 или соединение по любому из пп.25-31, для  
45 лечения патологии, опосредованной  $TNF_{\alpha}$ .

54. Молекула антитела по любому из пп.1-24 или 35-39, специфичная к  $TNF_{\alpha}$  человека, или соединение по любому из пп.25-34, для лечения патологии, опосредованной  $TNF_{\alpha}$ .

55. Молекула антитела или соединение по п.54 для лечения ревматоидного артрита или остеоартрита.

50 56. Молекула антитела по любому из пп.1-24 и 35-39, специфичная к  $TNF_{\alpha}$  человека, для получения лекарственного средства для лечения патологии, опосредованной  $TNF_{\alpha}$ .

57. Антитело по п.56, где патология представляет собой ревматоидный артрит или остеоартрит.

58. Вектор экспрессии pDNAEng-G1, показанный на фигуре 19.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Сравнения каркасных областей легкой цепи антитела  
hTNF40 и консенсусных последовательностей группы 1 человека

консенсусная последовательность группы 1 человека	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 83)
hTNF40	:	DIYMTQSQKFMSTISVGDRVSVTC (SEQ ID NO: 84)
консенсусная последовательность группы 1 человека	:	WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)
hTNF40	:	WYQOKPGOSP <del>K</del> ALIY (SEQ ID NO: 86)
консенсусная последовательность группы 1 человека	:	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITIS <del>S</del> LPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)
hTNF40	:	GV <del>P</del> YRFTGSGSGTDFTLTITIS <del>T</del> VOSED <del>L</del> EYFC (SEQ ID NO: 88)
консенсусная последовательность группы 1 человека	:	FGQGT <del>K</del> VEIKR (SEQ ID NO: 89)
hTNF40	:	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 90)

ФИГ.1

Сравнение каркасных областей тяжелой цепи антитела hTNF40 и  
консенсусных последовательностей группы 1 и группы 3 человека

консенсусная  
последовательность  
группы 1 человека  
hTNF40 : QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 91)  
: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (SEQ ID NO: 92)

консенсусная  
последовательность  
группы 1 человека  
hTNF40 : WVRQAPGQGLEWNG (SEQ ID NO: 93)  
: WVKQAPGKAEKWMG (SEQ ID NO: 94)

консенсусная  
последовательность  
группы 1 человека  
hTNF40 : RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 95)  
: RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO: 96)

консенсусная  
последовательность  
группы 1 человека  
hTNF40 : WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 97)  
: WGQGITLTVSS (SEQ ID NO: 98)

консенсусная  
последовательность  
группы 3 человека  
hTNF40 : EVQLVRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 106)  
: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (SEQ ID NO: 92)

консенсусная  
последовательность  
группы 3 человека  
hTNF40 : WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 107)  
: WVKQAPGKAEKWMG (SEQ ID NO: 94)

консенсусная  
последовательность  
группы 3 человека  
hTNF40 : RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 108)  
: RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO: 96)

консенсусная  
последовательность  
группы 3 человека  
hTNF40 : WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 109)  
: WGQGITLTVSS (SEQ ID NO: 98)

ФИГ.2



Последовательность CDR hTNF40

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPRIYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2' WINTYIGEPRIYADSVKKG (SEQ ID NO:2)

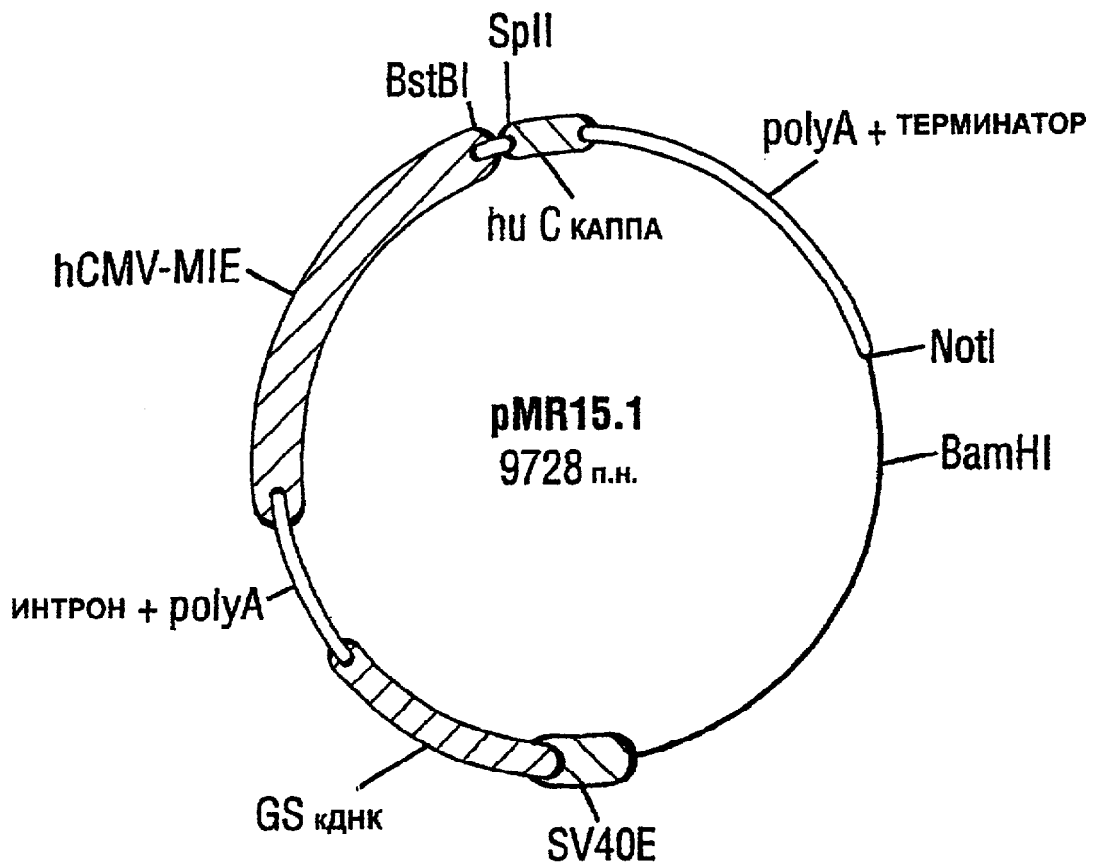
H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

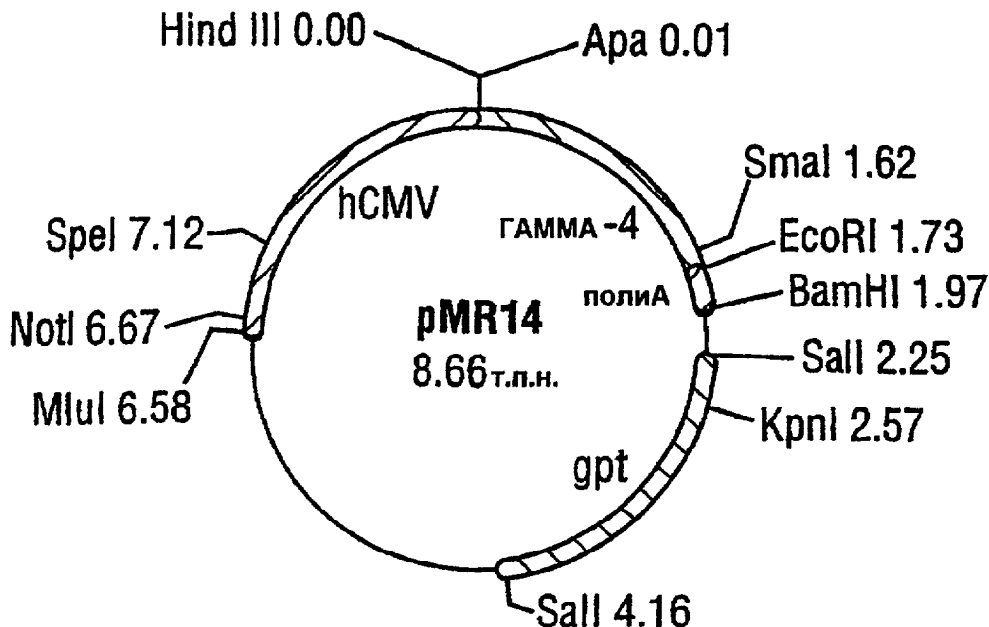
L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5

МЫШИНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VI 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	CGG	TCA	GTC	TTA	CAC	CCA	TGA	TTA	CAT	CGG	ACC	ATA
V	S	V	T	C	K	A	S	Q	N	V	G	T	N	V	A	W	Y>
110		120		130		140		150		160							
CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	CAA	TCT	CCT	AAA	GCA	CTG	ATT	TAC	TCG	GCA	TCC	TTC	CTA
GTT	GTC	TTT	GGT	CCT	GTT	AGA	GGA	TTT	CGT	GAC	TAA	ATG	AGC	CGT	AGG	AAG	GAT
Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	A	L	I	Y	S	A	S	F	L>
	170		180		190		200		210								
TAT	AGT	GGA	GTC	CCT	TAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT
ATA	TCA	CCT	CAG	GGA	ATA	GCG	AAG	TGT	CCG	TCA	CCT	AGA	CCC	TGT	CTA	AAG	TGA
Y	S	G	V	P	Y	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T>
	220		230		240		250		260		270						
CTC	ACC	ATC	AGC	ACT	GTG	CAG	TCT	GAA	GAC	TTG	GCA	GAG	TAT	TTC	TGT	CAG	CAA
GAG	TGG	TAG	TCG	TGA	CAC	GTC	AGA	CTT	CTG	AAC	CGT	CTC	ATA	AAG	ACA	GTC	GTT
L	T	I	S	T	V	Q	S	E	D	L	A	E	Y	F	C	Q	Q>
	280		290		300		310		320								
TAT	AAC	ATC	TAT	CCT	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	CTG	AAA	CGT
ATA	TTG	TAG	ATA	GGA	GAG	TGC	AAG	CCA	CGA	CCC	TGG	TTC	GAC	CTC	GAC	TTT	GCA
Y	N	I	Y	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	R>

ФИГ.6

## МЫШИНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Vh hTNF40 (SEQ ID NO:100)

```

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

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

110      120      130      140      150      160
GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GCT TTC AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC
CAC TTC GTC CGA GGT CCT TTC CGA AAG TTC ACC TAC 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 GAG TTT TTA CTC CTG
  E  T  S  A  S  T  A  F  L  Q  I  N  N  L  K  N  E  D>

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

```

ФИГ.7

## ПРИВИТАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VI 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 GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
  D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

      60      70      80      90      100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC 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   S   G   T   D   F   T>

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

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

```

ФИГ.8

## ПРИВИТАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VI 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   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 CTC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT GAG GAG TAG ATG TCA CGG AGA AAG GAG
  Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   S   A   S   F   L>

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

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

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

```

ФИГ.9

ПРИВИТАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Vh hTNF40(SEQ ID NO:10)

	10		20		30		40		50										
	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCA	GGA	GCA	GAG	GTT	AAG	AAG	CCT	GGT	GCT	TCC	GTC	
	GTC	CAC	GTG	GAC	CAG	GTG	AGT	CCT	CGT	CTC	CAA	TTC	TTC	GGA	CCA	CGA	AGG	CAG	
	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V>	
		60		70		80		90		100									
	AAA	GTT	TCG	TGT	AAG	GCC	TCA	GGC	TAC	GTG	TTC	ACA	GAC	TAT	GGT	ATG	AAT	TGG	
	TTT	CAA	AGC	ACA	TTC	CGG	AGT	CCG	ATG	CAC	AAG	TGT	CTG	ATA	CCA	TAC	TTA	ACC	
	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	V	F	T	D	Y	G	M	N	W>	
110			120		130		140		150		160								
	GTG	AGA	CAG	GCC	CCG	GGA	CAA	GGC	CTG	GAA	TGG	ATG	GGT	TGG	ATT	AAT	ACT	TAC	
	CAG	TCT	GTG	CGG	GGC	CCT	GTT	CCG	GAC	CTT	ACC	TAC	CCA	ACC	TAA	TTA	TGA	ATG	
	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	Y>	
		170		180		190		200		210									
	ATT	GGA	GAG	CCT	ATT	TAT	GCT	CAA	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTG	ACG	TTC	ACT	CTA	
	TAA	CCT	CTC	GGA	TAA	ATA	CGA	GTT	TTC	AAG	GTG	CCG	TCT	CAG	TGC	AAG	TGA	GAT	
	I	G	E	P	I	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	F	T	L>	
		220		230		240		250		260		270							
	GAC	ACC	TCC	ACA	AGC	ACT	GCA	TAC	ATG	GAG	CTG	TCA	TCT	CTG	AGA	TCC	GAG	GAC	
	CTG	TGG	AGG	TGT	TCG	TGA	CGT	ATG	TAC	CTC	GAC	AGT	AGA	GAC	TCT	AGG	CTC	CTG	
	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D>	
		280		290		300		310		320									
	ACC	GCA	GTG	TAC	TAT	TGT	GCT	AGA	GGA	TAC	AGA	TCT	TAT	GCC	ATG	GAC	TAC	TGG	
	TGG	CGT	CAC	ATG	ATA	ACA	CGA	TCT	CCT	ATG	TCT	AGA	ATA	CGG	TAC	CTG	ATG	ACC	
	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	Y	R	S	Y	A	M	D	Y	W>	
		330		340		350													
	GGC	CAG	GGT	ACC	CTA	GTG	ACA	GTG	TCC	TCA									
	CCG	GTG	CCA	TGG	GAT	CAG	TGT	CAO	AGG	AGT									
	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S>									

ФИГ.10

## ПРИВИТАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Vh 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   G   L   V   Q   P   G   G   S   L>

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

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

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

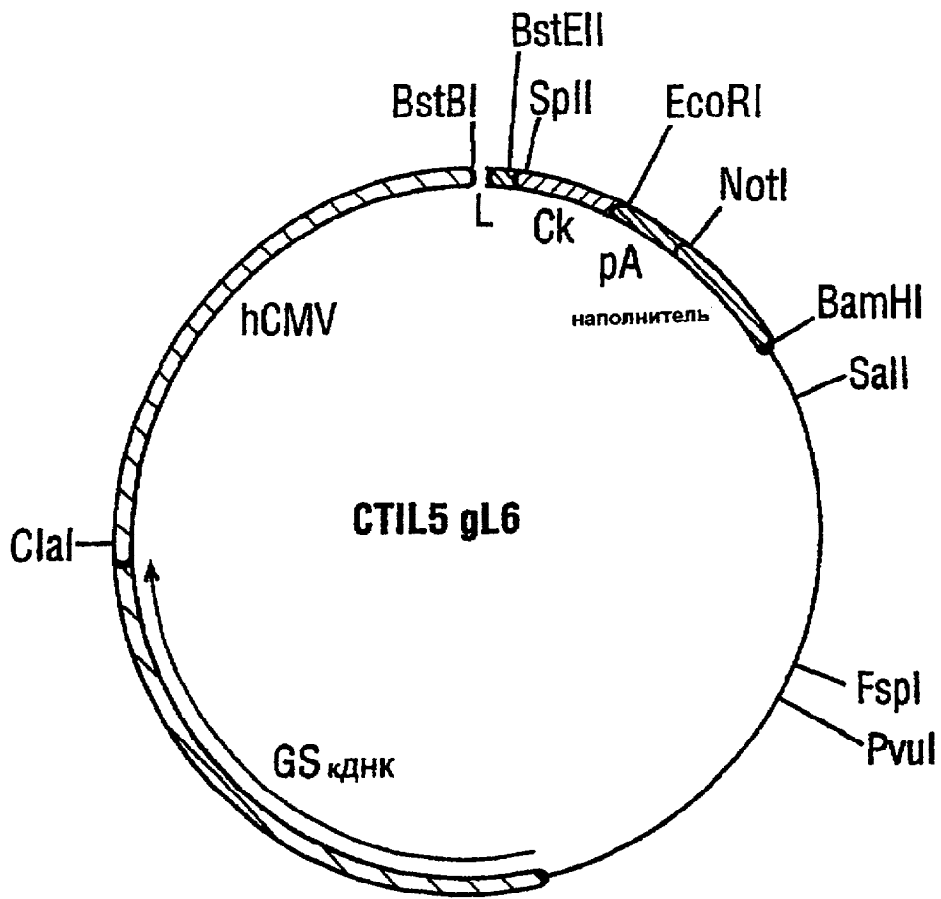
      220      230      240      250      260      270
GAC ACA TCC AAG TCA ACA GCA TAC CTC CAA ATG AAT AGC CTG AGA GCA GAG GAC
CTG TGT AGG TTC AGT TGT CGT ATG GAG GTT TAC TTA TCG GAC TCT CGT CTC CTG
D   T   S   K   S   T   A   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D>

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

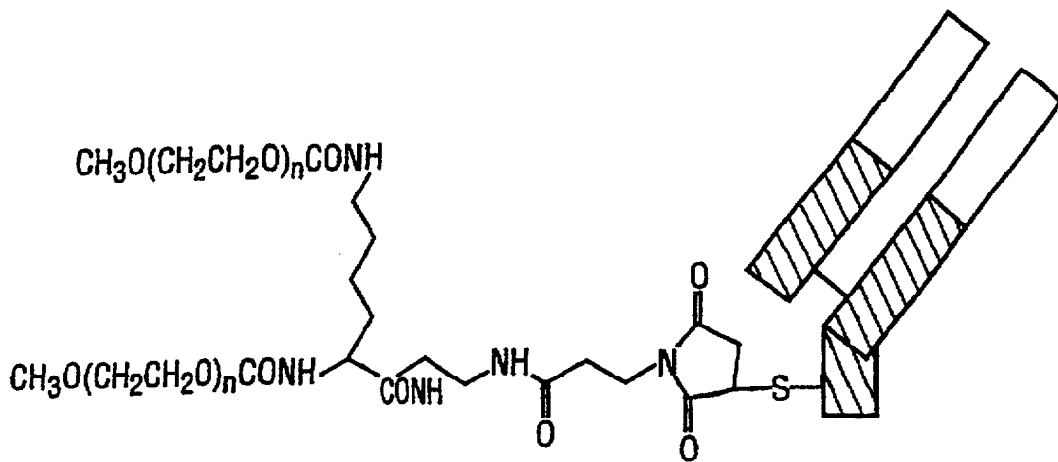
      330      340      350
GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA
CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT
G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S>

```

ФИГ.11

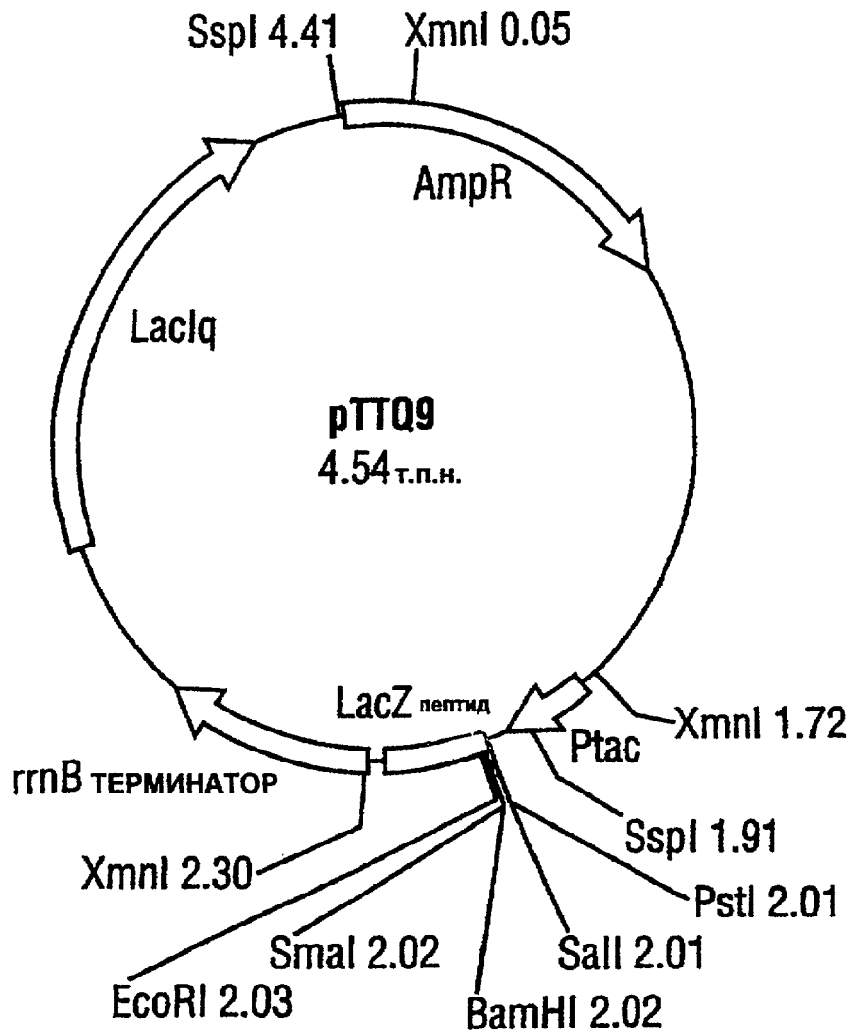


ФИГ.12



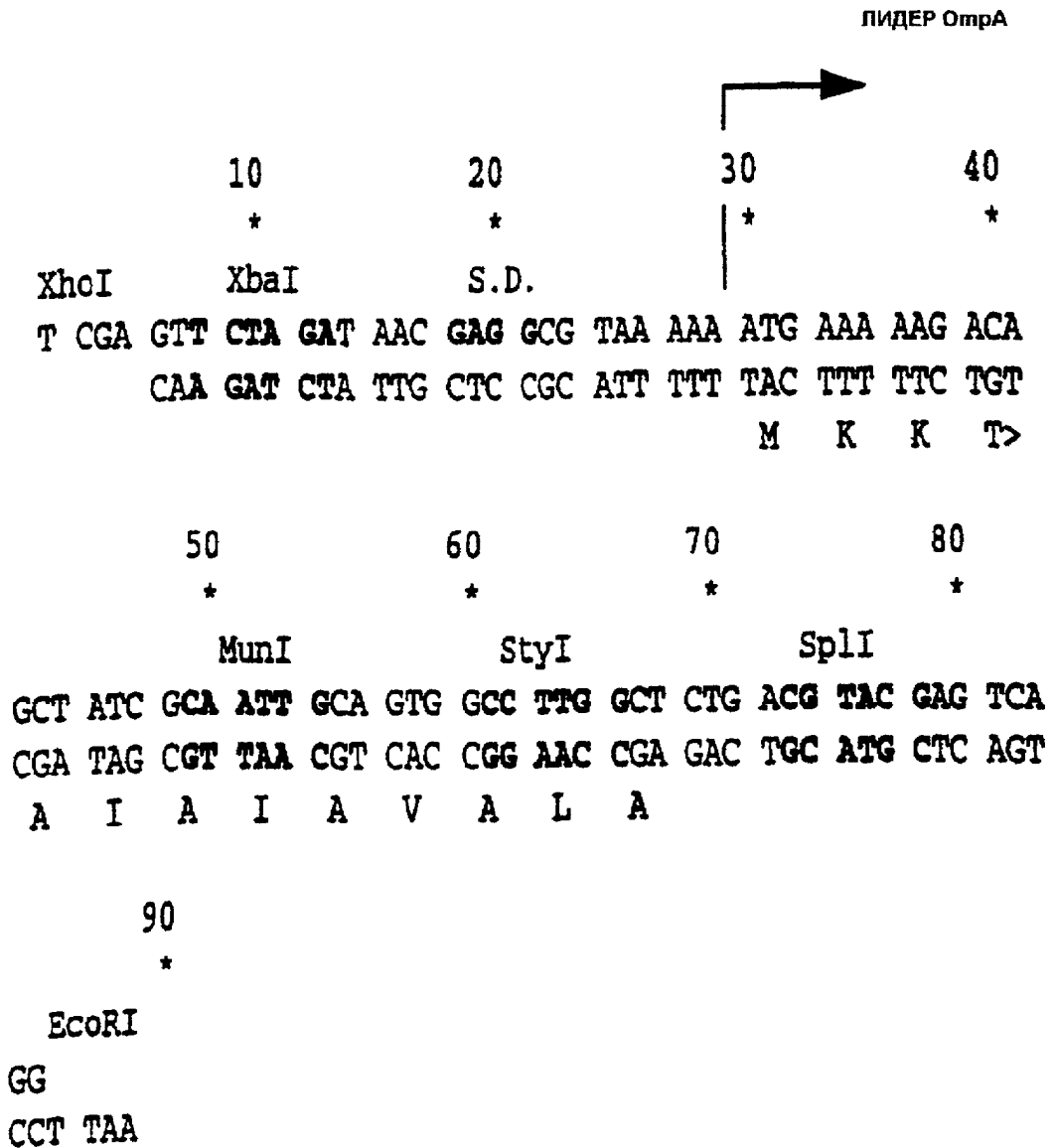
ФИГ.13





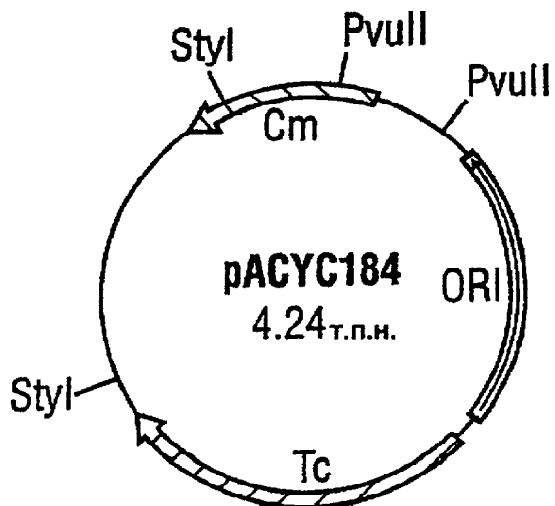
ФИГ.14

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО АДАПТЕРА OmpA  
(SEQ ID NO:101)

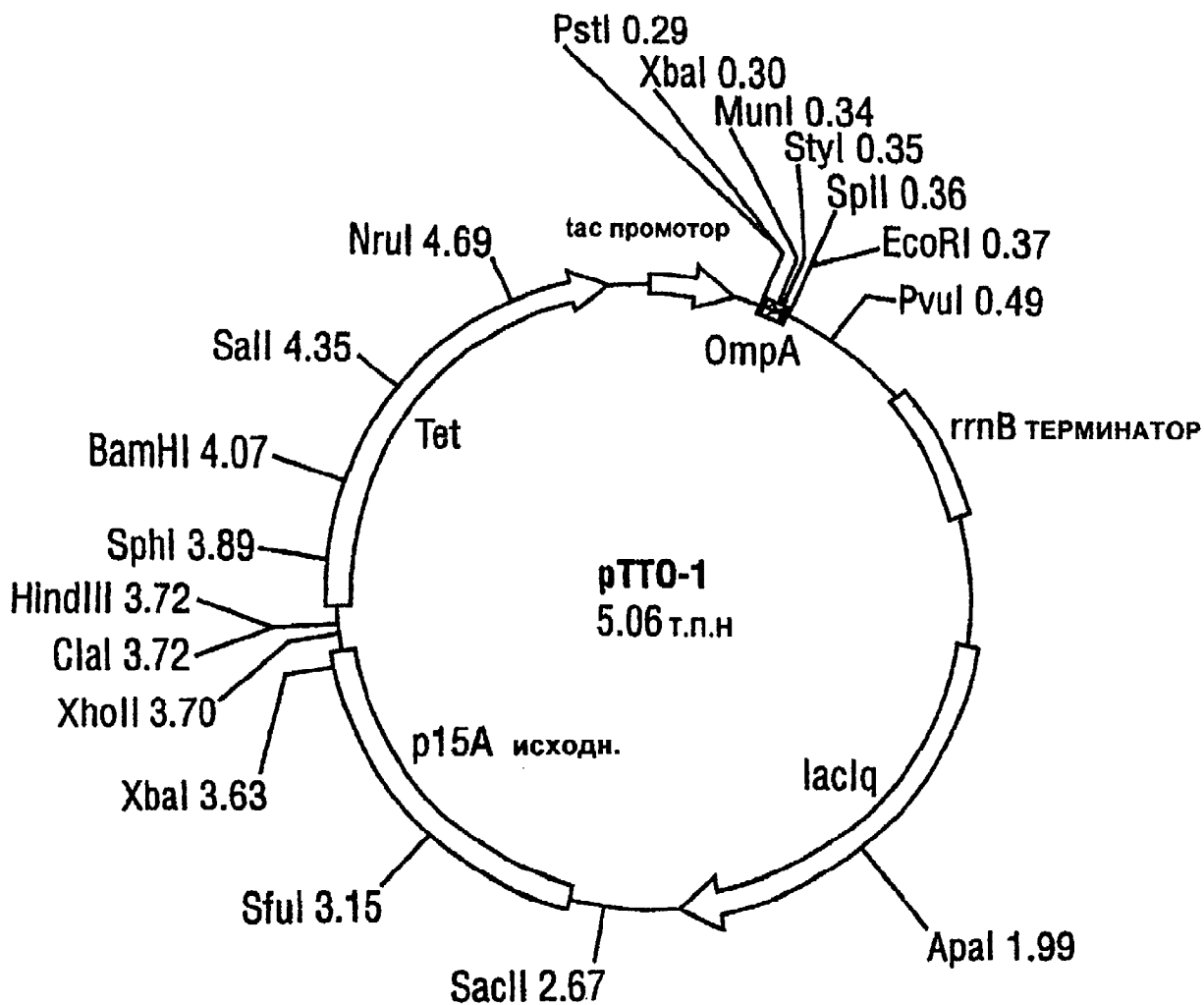


- ВНУТРЕННИЕ САЙТЫ РЕСТРИКЦИИ ПОКАЗАНЫ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ
- 5' -XhoI-ЛИПКИЙ КОНЕЦ ЛИГИРУЕТСЯ В САЙТ SalI ВЕКТОРА, БЛОКИРУЯ ЕГО
- S.D. ОБОЗНАЧАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ШАЙНА-ДАЛГАРНО OmpA

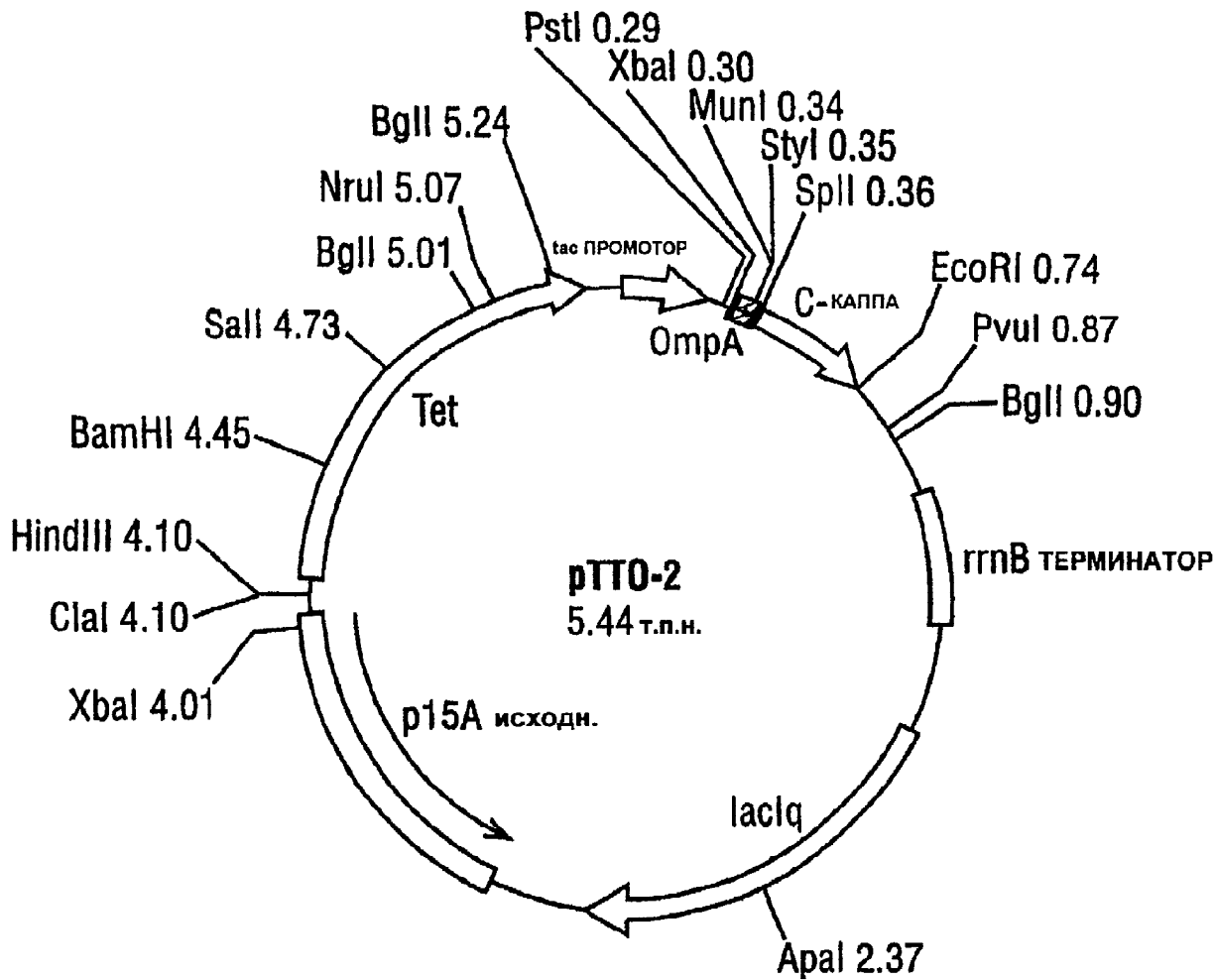
ФИГ.15



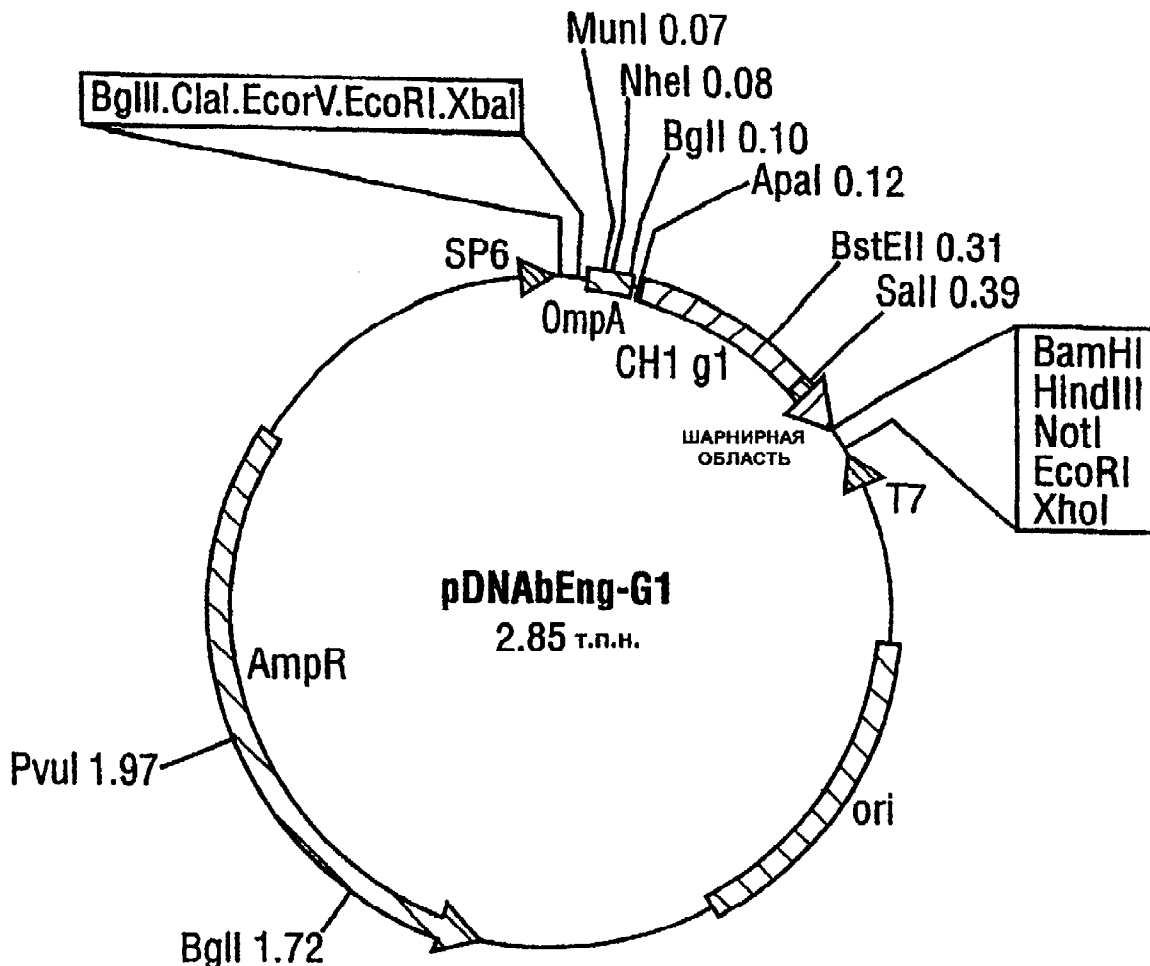
ФИГ.16



ФИГ.17



ФИГ.18



ФИГ.19

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КАССЕТЫ, КОДИРУЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ МЕЖГЕННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ Fab E.coli

IGS кассета-1; Межгенное расстояние = -1

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

S S P V T K S F N R G E C \* M K K T A I A I  
 Конец с-каппа-последовательности → Начало последовательности OmpA →

IGS кассета-2; Межгенное расстояние = +1

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

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

IGS кассета-3; Межгенное расстояние = +13

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

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

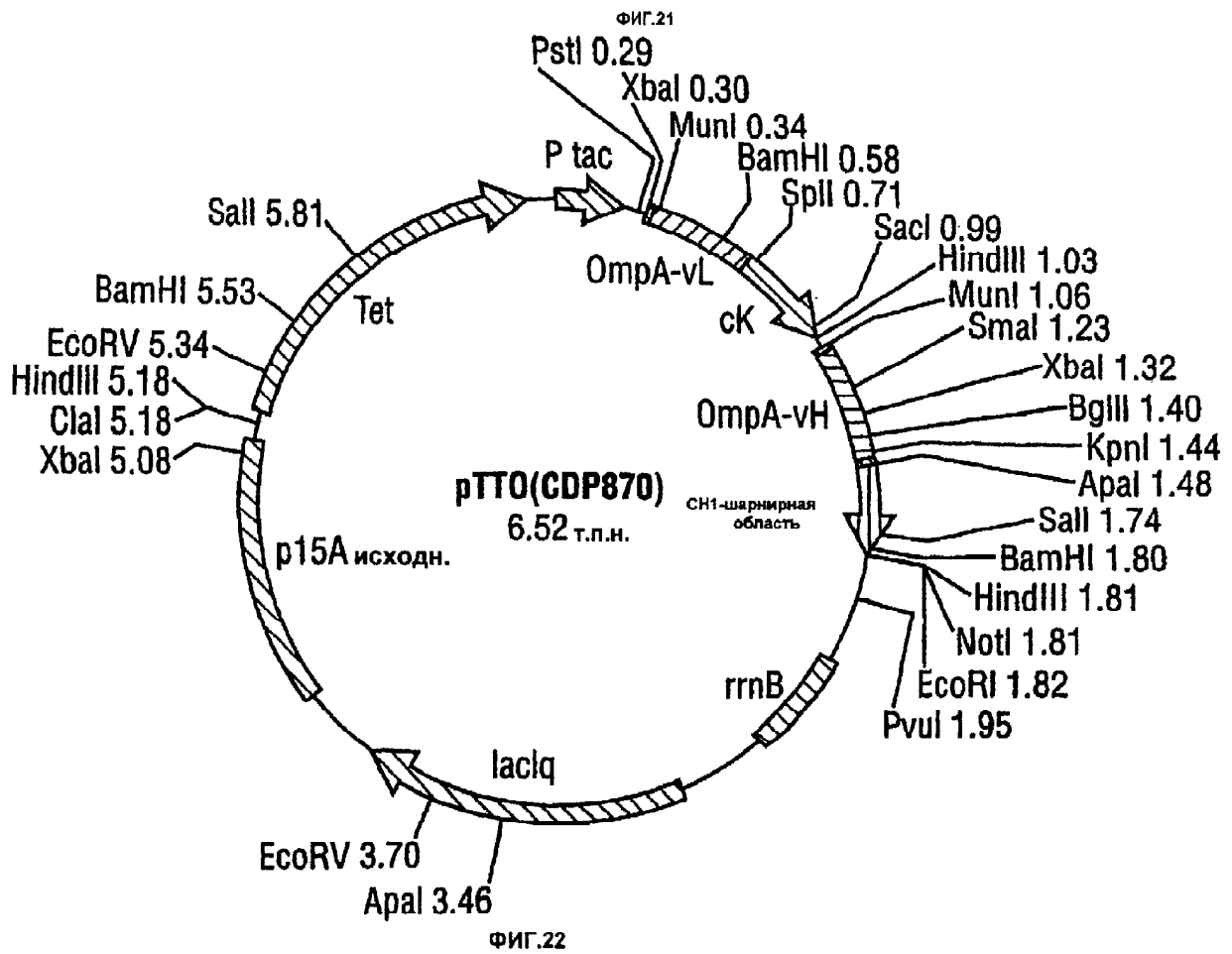
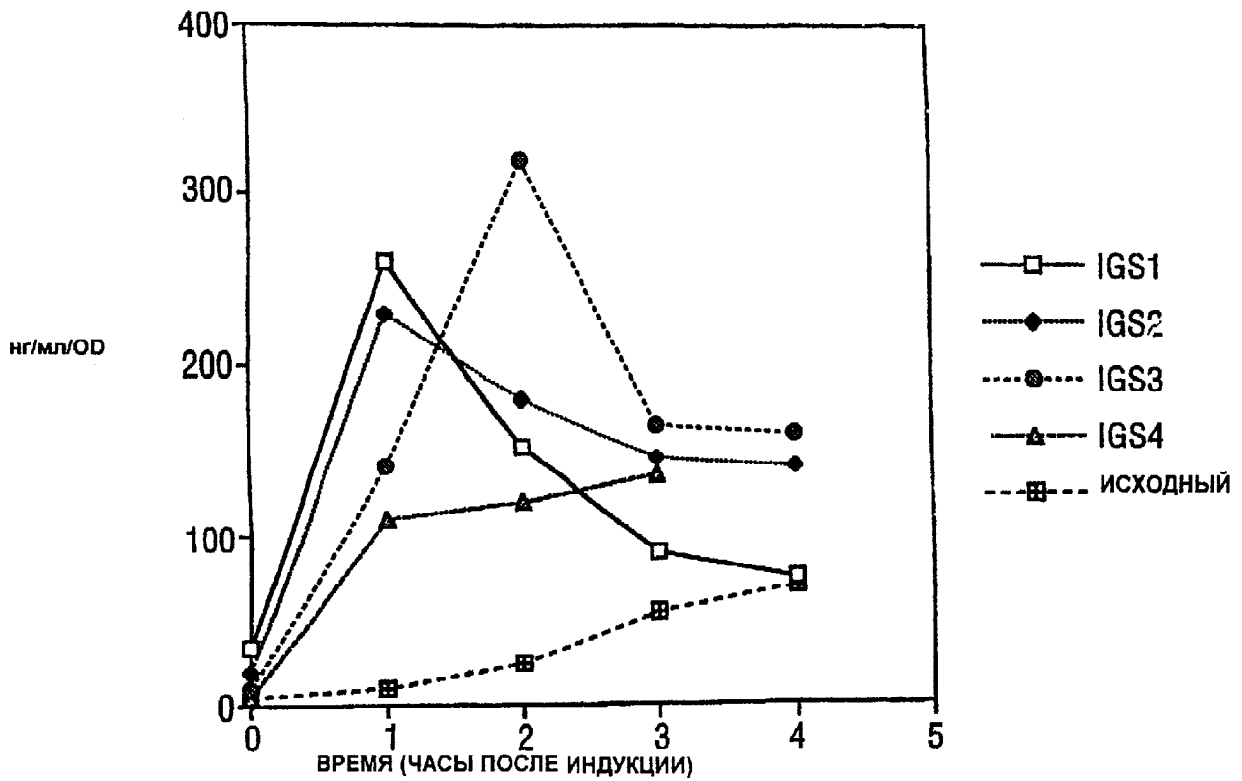
IGS кассета-4; Межгенное расстояние = +13

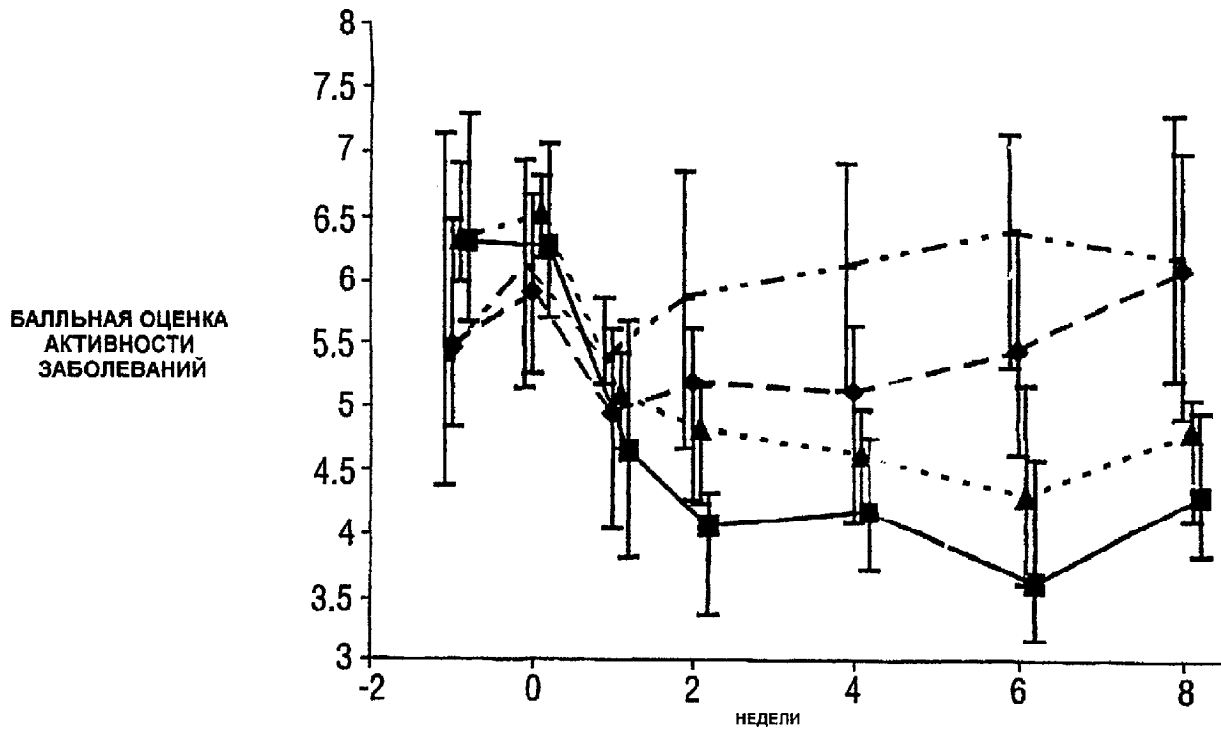
G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGAGGATTATATAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 105)

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

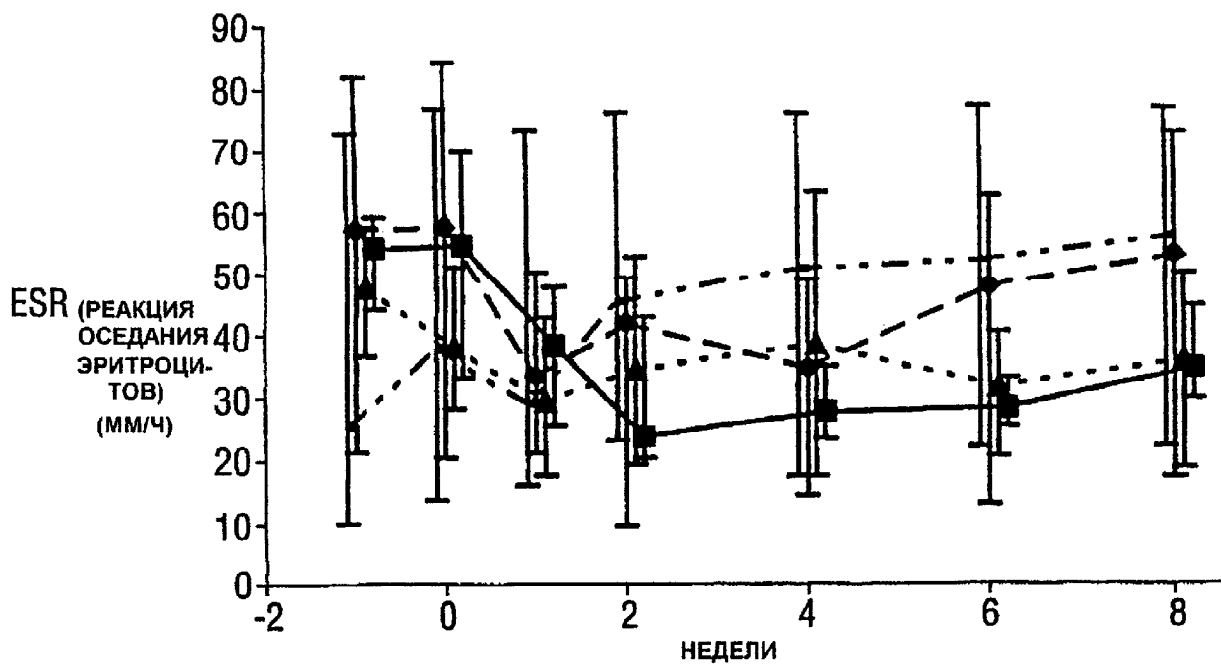
ФИГ.20

НАКОПЛЕНИЕ Fab' ВАРИАНТЫ IGS

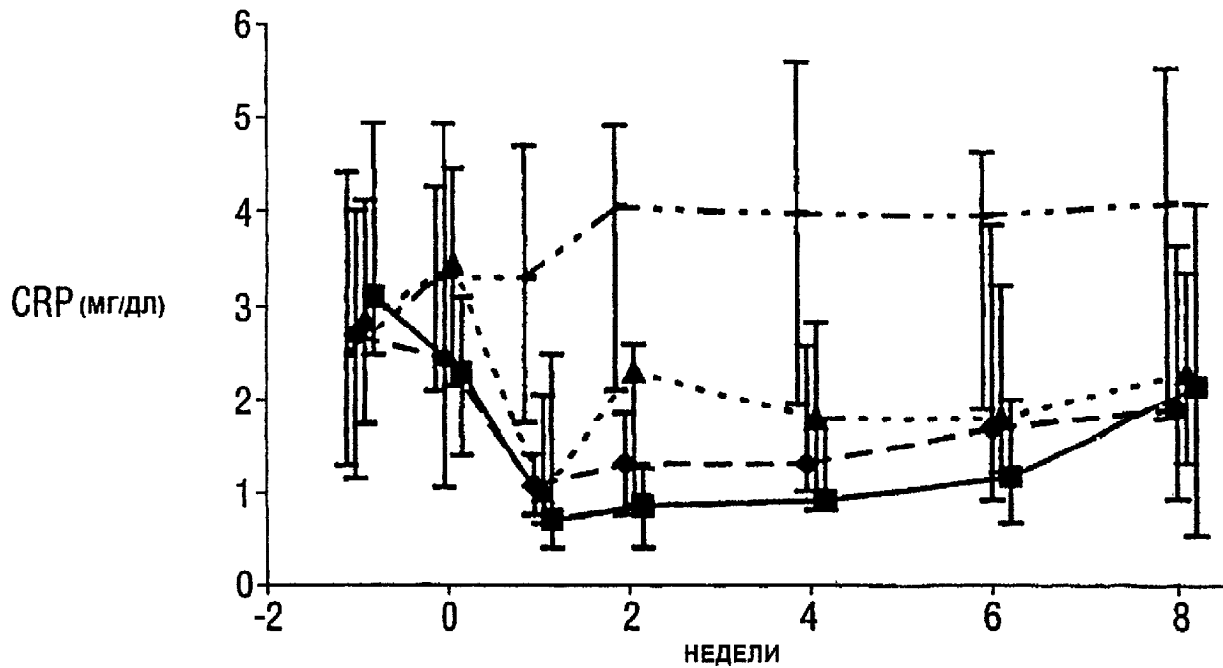




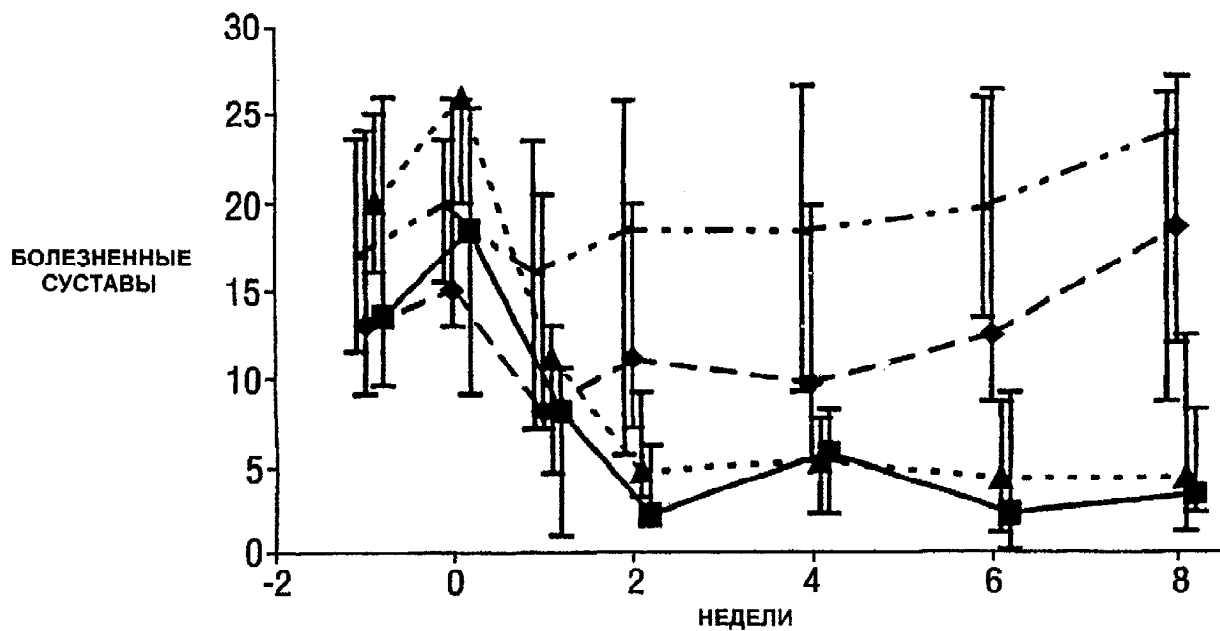
ФИГ.23



ФИГ.24

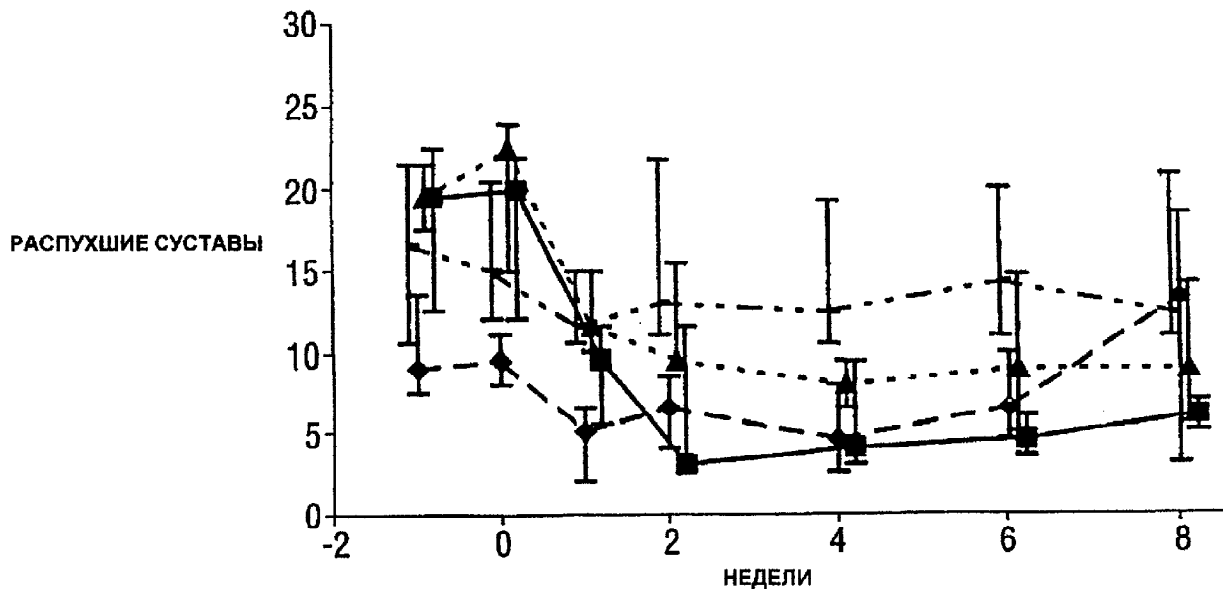


ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

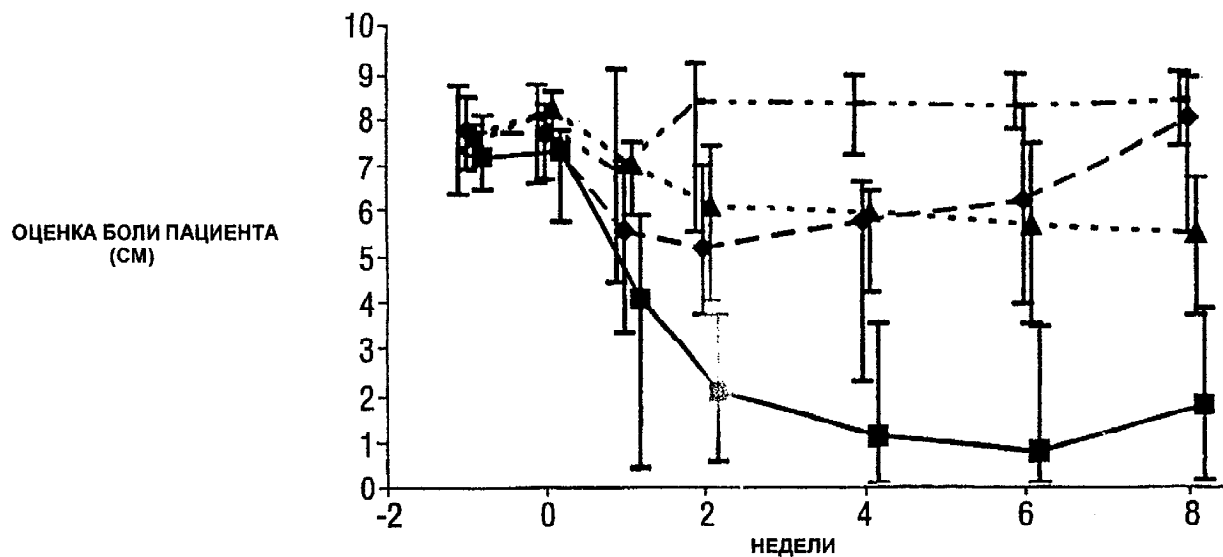


ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

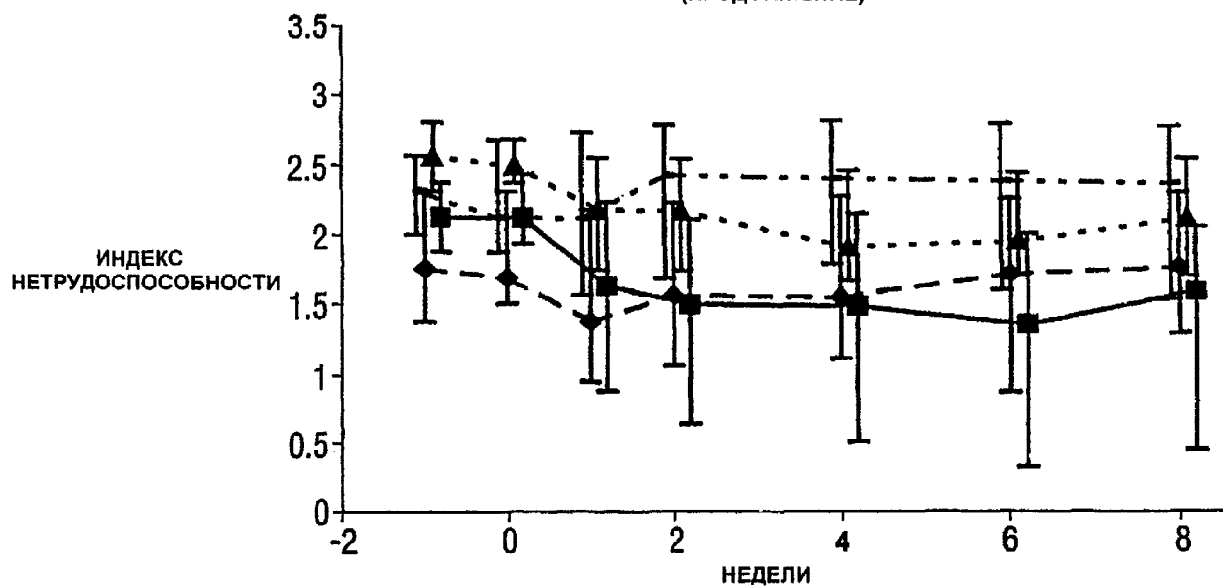




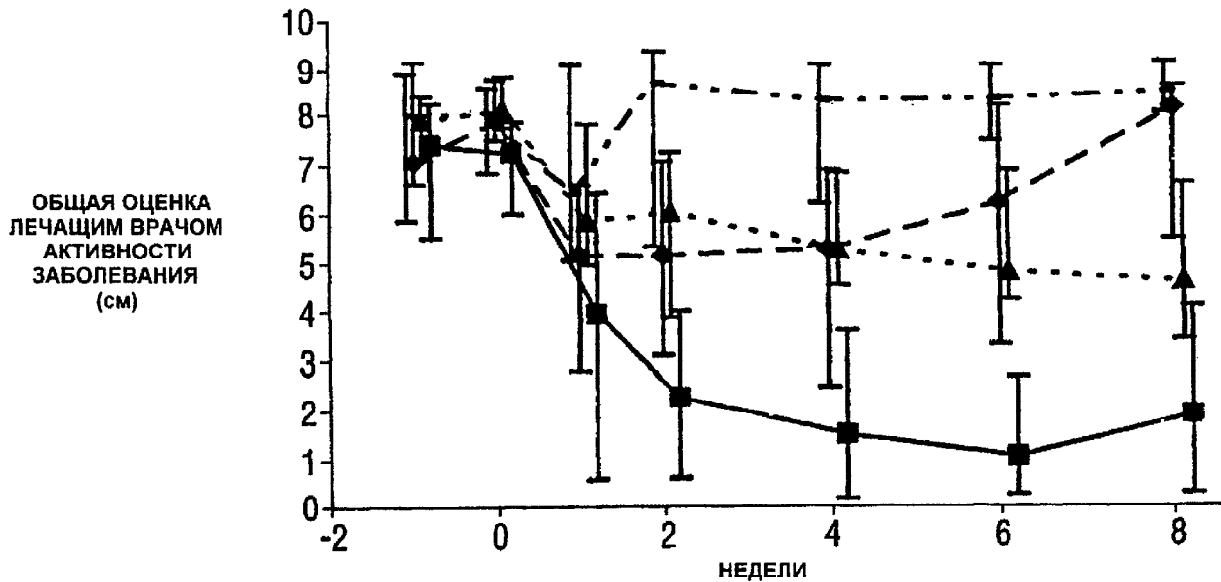
ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



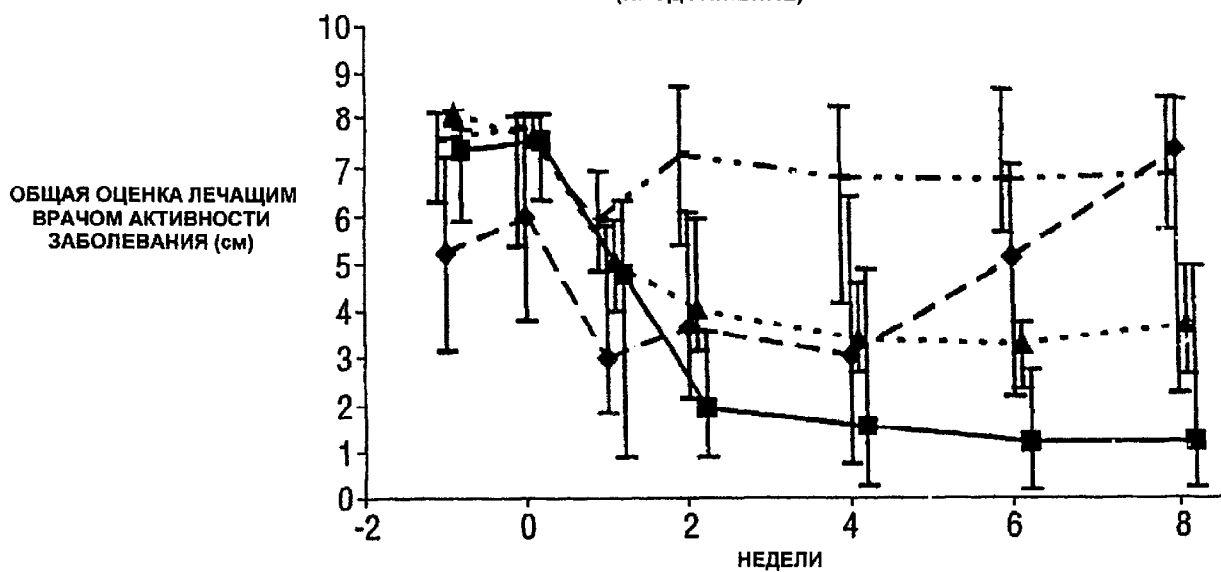
ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



ФИГ.24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)