

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.06.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.06.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0013810**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/GB01/02477**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/94585**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 837

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N	15/13	A 61 K	39/395
C 07 K	16/24	A 61 P	19/02
C 07 K	16/46	A 61 P	37/06
A 61 K	47/48		
C 07 K	19/00		
C 12 N	15/62		
C 12 N	15/70		
C 12 N	1/21		

(71) Přihlašovatel:

CELLTECH R & D LIMITED, Slough, GB;

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Molekuly protilátky, které jsou specifické pro
humánní nádorový nekrotický faktor alfa a jejich
použití**

(57) Anotace:

Předkládaný vynález se týká protilátkových molekul, které jsou specifické pro antigenní determinanty nádorového nekrotického faktoru alfa (TNF α), a které obsahují alespoň jeden úsek CDR z myši monoklonální protilátky. Předkládaný vynález se také týká tzv. CDR-roubovaných protilátek, kde alespoň jeden z úseků CDR je hybridní CDR. Dále je předmětem vynálezu DNA sekvence kódující řetězec molekuly protilátky, a také vektory a transformované hostitelské buňky. Vynález se dále týká terapeutického využití protilátkových molekul k léčení nemocí zprostředkovaných TNF α .

08.03.02

1

PV 402-837

18219

Molekuly protilátky, které jsou specifické pro humánní nádorový nekrotický faktor alfa a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká molekul protilátky, které jsou specifické pro antigenní determinanty nádorového nekrotického faktoru alfa (TNF α , „tumour necrosis factor alpha“). Předkládaný vynález se také týká terapeutického použití protilátkových molekul a způsobů výroby protilátkových molekul.

Dosavadní stav techniky

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

Kabatovo označení zbytků neodpovídá vždy přímo lineárnímu číslování aminokyselinových zbytků. Aktuální lineární aminokyselinová sekvence může obsahovat méně aminokyselin nebo další aminokyseliny, než v přesném Kabatově číslování, což odpovídá zkrácení strukturální složky nebo vložení (inzerci) do strukturální složky, ať už do úseku rámce nebo do CDR,

základní struktury variabilní domény. Správné Kabatovo číslování zbytků může být pro danou protilátku zjištěno porovnáním homologie zbytků v sekvenci protilátky se „standardní“ sekvencí číslanou dle Kabata.

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

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

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

Rané práce týkající se humanizace monoklonálních protilátek prostřednictvím CDR-roubování byly prováděny na monoklonálních protilátkách rozpoznávajících syntetické antigeny, jako je například NP. Ale byly popsány příklady, ve kterých myš monoklonální protilátka rozpoznávající lysozym a monoklonální protilátka laboratorního potkana rozpoznávající antigen na humánních T lymfocytech byly humanizovány pomocí CDR-roubování, a to autory Verhoeyen a kol. (Science, 239, 1534-1536, 1988) a Riechmann a kol. (Nature, 332, 323-324, 1988), v daném pořadí.

Riechmann a kol., zjistili, že transfer samotných CDR (jak definovány Kabatem (Kabat a kol. (výše) a Wu a kol., J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) nebyl postačující pro vznik uspokojivé aktivity vázající antigen u CDR-roubovaného produktu. Bylo zjištěno, že musí být změněn velký počet zbytků

rámce tak, aby odpovídaly zbytkům úseku rámce dárce. Navrhovaná kritéria pro výběr, které zbytky rámce potřebují být změněny, jsou popsána v mezinárodní patentové přihlášce WO 90/07861.

Byl publikován velký počet přehledů pojednávajících o CDR-roubovan protilátkách, včetně Vaughan a kol. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

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

Ve stavu techniky byl popsány monoklonální protilátky proti TNF α . Meager a kol., (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) popsali myší monoklonální protilátky proti rekombinantnímu TNF α . Fendly a kol., (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) popsali použití myších monoklonálních protilátek proti rekombinantnímu TNF α při definování neutralizaci epitopů na TNF. Shimamoto a kol., (Imunology Letters, 17, 311-318, 1988) popsali použití myších monoklonálních protilátek proti TNF γ a jejich použití při prevenci endotoxického šoku u myší. Dále, v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/11383, jsou popsány rekombinantní

protilátky, včetně CDR-roubovaných protilátek, specifických pro TNF α ,. Rankin a kol., (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) popsali použití těchto CDR-roubovaných protilátek v léčení revmatoidní artritidy. US-A-5 919 452 popisuje anti-TNF chimérické protilátky a jejich použití v léčení patologických stavů spojených s výskytem TNF.

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

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

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

V současnosti jsou schváleny dva produkty blokuující TNF α pro léčení revmatoidní artritidy. První, nazvaný etanercept, je dodáván na trh firmou Immunex Corporation jako EnbrelTM. Je to rekombinantní fúzní protein obsahující dva p75 rozpustné domény TNF-receptoru spojené k Fc části humánního imunoglobulinu. Druhý, nazvaný infliximab, je dodáván na trh firmou Centocor Corporation RemicadeTM. Je to chimérická protilátka mající myší anti-TNF α variabilní domény a humánní IgG1 konstantní domény.

Rekombinantní anti-TNF α protilátkové molekuly podle stavu techniky obecně mají redukovanou afinitu pro TNF α ve srovnání s protilátkami, ze kterých variabilní úseky nebo CDR pocházejí, obecně musí být tvořeny v savčích buňkách a jsou pro výrobu nákladné. anti-TNF α protilátky podle stavu techniky jsou popsány v práci autorů Stefen a kol., (Immunology, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570 a GB-A-2 297 145.

Existuje trvalá potřeba protilátkových molekul k léčení chronických zánětlivých onemocnění, které mohou být používány opakovaně a vyrábí se snadno a účinně. Existuje také potřeba protilátkových molekul, které mají vysokou afinitu pro TNF α a pro člověka jsou málo imunogenní.

Podstata vynálezu

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

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

Ve druhém aspektu předkládaného vynálezu je poskytnuta protilátková molekula specifická pro humánní TNF α , obsahující lehký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak definováno Kabatem a kol., (výše)) mající sekvenci označenou jako L1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 4) pro CDRL1, L2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 5) pro CDRL2 nebo L3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 6) pro CDRL3.

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

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

Protilátková molekula podle prvního nebo druhého aspektu předkládaného vynálezu obsahuje výhodně těžký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak definováno Kabatem a kol., (výše)) mající sekvenci označenou jako H1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 1) pro CDRH1, H2' nebo H2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 7) pro CDRH2 nebo H3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 3) pro CDRH3 a lehký řetězec, kde variabilní doména obsahuje CDR (jak definováno Kabatem a kol., (výše)) mající sekvenci označenou jako L1 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 4) pro

CDRL1, L2 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 5) pro CDRL2 nebo L3 na obrázku 3 (SEKV. ID. Č. 6) pro CDRL3.

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

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

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

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

Ve třetím výhodném provedení je protilátka podle prvního a druhého aspektu předkládaného vynálezu CDR-roubovaná protilátková molekula. Termín „CDR-roubovaná protilátková molekula“, použitý v tomto textu, se týká protilátkové

molekuly, kde těžký a/nebo lehký řetězec obsahují jeden nebo více CDR (včetně, je-li to žádoucí, hybridního CDR) z donorové (dárcovské) protilátky (např. myší monoklonální protilátky) naroubované na variabilní úsek rámce těžkého a/nebo lehkého řetězce akceptorové (příjemcovské) protilátky (např. humánní protilátky).

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

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

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

V CDR-roubovaných protilátkách podle předkládaného vynálezu úseky rámce nemusí také mít přesně tutéž sekvenci,

jako je sekvence příjemcovské protilátky. Například, neobvyklé zbytky mohou být změněny na častěji se vyskytující zbytky pro danou třídu nebo typ příjemcovského řetězce. Alternativně, vybrané zbytky v příjemcovských úsecích rámce mohou být změněny tak, že odpovídají zbytku nalezenému ve stejné poloze v dárcovské protilátce. Takové změny by měly být udržovány na minimu nezbytném k obnovení afinity dárcovské protilátky. Protokol pro selekci zbytků v příjemcovských úsecích rámce, které mohou potřebovat změnu, je uveden ve WO 91/09967.

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

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

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

Výhodně, v CDR-roubované protilátkové molekule podle předkládaného vynálezu, jestliže příjemcovský lehký řetězec má úseky rámce humánní skupiny 1 (ukázána na obrázku 1) (SEKV. ID. Č. 83, 85, 87 a 89), pak příjemcovské úseky rámce lehkého

řetězce obsahují dárcovské zbytky v polohách 46 a 60 (podle Kabat a kol. (výše)).

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

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

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

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

uvedená v SEKV. ID. Č. 115 je výhodně kódována nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEKV. ID. Č. 114.

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

Polymerové molekuly mohou být obecně syntetické nebo přirozeně se vyskytující polymery, například volitelně substituovaný polymer polyalkylenu, polyalkenylenu nebo polyoxyalkylenu s přímým nebo rozvětveným řetězcem, nebo polysacharid s rozvětveným nebo nerozvětveným řetězcem, např. homo- nebo heteropolysacharid.

Konkrétní volitelné substituenty, které mohou být přítomny na výše uvedených syntetických polymerech, zahrnují jednu nebo více hydroxyskupin, methylových skupin nebo methoxyskupin. Konkrétní příklady syntetických polymerů zahrnují volitelně substituovaný poly(ethylenglykol), poly(propylenglykol), poly(vinylalkohol) nebo jejich deriváty s přímými nebo rozvětvenými řetězci, zejména volitelně substituovaný poly(ethylenglykol), jako je například methoxypoly(ethylenglykol) nebo jejich deriváty. Konkrétní přirozeně se vyskytující polymery zahrnují laktózu, amylózu, dextran, glykogen nebo jejich deriváty. Termín „deriváty“, jak je použit v tomto textu, zahrnuje reaktivní deriváty, například thiol-selektivní reaktivní skupiny, jako jsou například maleimidy apod. Reaktivní skupina může být připojena k polymeru přímo nebo přes spojovací segment. Je nutné rozumět, že zbytek takové skupiny v některých případech tvoří instance část produktu jako spojovací skupina mezi protilátkovým fragmentem a polymerem.

Velikost polymeru může být měněna dle přání, ale obecně je v průměrném rozmezí molekulových hmotností od 500 (Da) do 50000 (Da), výhodně 5000 až 40000 (Da) a výhodněji 25000 až 40000 (Da). Velikost polymeru může být konkrétně vybrána na

základě zamýšleného použití produktu. Tedy, například, když je zamýšleno, aby produkt opustil cirkulaci a pronikl do tkání, například pro použití při léčení nádorů, může být výhodné použít polymer s nízkou molekulovou hmotností, například s molekulovou hmotností přibližně 5000 (Da). Pro aplikace, při kterých produkt v cirkulaci zůstává, může být výhodné použít polymer s vyšší molekulovou hmotností, mající například molekulovou hmotnost v rozmezí 25000 (Da) až 40000 (Da).

Obzvláště výhodné polymery zahrnují polyalkylenové polymery, jako je například poly(ethylenglykol) nebo, zejména, methoxypoly(ethylenglykol) nebo jejich deriváty a zejména polymery s molekulovou hmotností v rozmezí přibližně 25000 (Da) až přibližně 40000 (Da).

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

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

Pro přípravu protilátkových fragmentů modifikovaných polymerem popsaných výše může být použit jako výchozí látka každý aktivovaný polymer. Aktivovaný polymer může být každý polymer obsahující thiolovou reaktivní skupinu, jako je například α -halogenkarboxylová kyselina nebo ester, např. jodacetamid, imid, např. maleimid, vinylsulfon nebo disulfid. Tato výchozí látka může být získána komerčně (například od

firmy Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) nebo může být připravena z komerčně dostupných výchozích látek s použitím obvyklých chemických postupů.

Co se týče připojení poly(ethylen glykol)ových (PEG) skupin, odkazuje se na práce „Poly(ethylen glykol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications“, 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, „Poly(ethylen glykol) Chemistry and Biological Applications“, 1997, J. Milton Harris a S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC a "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam a A. Dent, Grove Publishers, New York.

Když je třeba získat protilátkový fragment připojený k efektorové nebo reportérové molekule, může to být připraveno standardními chemickými postupy nebo technikami rekombinantní DNA, kdy je protilátkový fragment spojen buď přímo nebo prostřednictvím kondenzačního činidla k efektorové nebo reportérové molekule buď před nebo po reakci s vhodným aktivovaným polymerem. Konkrétní chemické postupy zahrnují, například, postupy popsané ve WO 93/62331, WO 92/22583, WO 90,195 a WO 89/1476. Alternativně, když je efektorová nebo reportérová molekula protein nebo polypeptid, může být spojení dosaženo s použitím postupů rekombinantní DNA, popsaných například ve WO 86/01533 a EP-A-0392745.

Výhodně, modifikovaný Fab fragment podle předkládaného vynálezu je PEGylován (tj. má k sobě kovalentně připojen PEG (poly(ethylen glykol))) podle metody popsané v EP-A-0948544. Výhodně protilátková molekula podle předkládaného vynálezu je PEGylovaný modifikovaný Fab fragment ukázaný na obrázku 13. Jak je ukázáno na obrázku 13, modifikovaný Fab fragment má maleimidovou skupinu kovalentně připojenou k jedné thiolové skupině v modifikovaném kloubovém úseku. K maleimidové skupině je kovalentně připojen zbytek lysinu. Ke každé aminoskupině na

lysinovém zbytku je připojen polymer methoxypoly(ethylenglykol)u mající molekulovou hmotnost přibližně 20000 (Da). Celková molekulová hmotnost celé efektorové molekuly je tudíž přibližně 40000 (Da).

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

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

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

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

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

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

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

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

V jednom výhodném provedení DNA sekvence kóduje lehký řetězec a obsahuje sekvence ukázané v SEKV. ID. Č. 8 (hTNF40-gL1) nebo SEKV. ID. Č. 9 (h-TNF40-gL2) nebo jejich degenerované ekvivalenty.

V alternativním výhodném provedení DNA sekvence kóduje těžký řetězec a obsahuje sekvence ukázané v SEKV. ID. Č. 10 (gh1hTNF40.4) nebo SEKV. ID. Č. 11 (gh3hTNF40.4) nebo jejich degenerované ekvivalenty.

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

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

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

Předkládaný vynález také obsahuje vektor pDNAbEng-G1, jak je ukázán na obrázku 19.

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

DNA sekvence, které kódují protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu mohou být získány metodami, které odborníci dobře znají. Například, DNA sekvence kódující část nebo celý protilátkový těžký a lehký řetězec mohou být

syntetizovány dle přání ze zjištěných DNA sekvencí nebo na základě odpovídajících aminokyselinových sekvencí.

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

Standardní techniky molekulární biologie mohou být použity pro přípravu DNA sekvencí kódujících protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu. Požadované DNA sekvence mohou být syntetizovány kompletně nebo částečně s použitím technik syntézy pomocí oligonukleotidů. Vhodně mohou být použity techniky místně cílené mutagenese a polymerázové řetězové reakce (PCR).

Každý vhodný systém hostitelská buňka/vektor může být použit pro expresi DNA sekvence kódující protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu. Může být použit bakteriální systém, například *E. coli*, a další mikrobiální systémy, částečně, pro expresi protilátkových fragmentů, jako jsou například Fab a $F(ab')_2$ fragmenty a zejména Fv fragmenty a fragmenty protilátky s jedním řetězcem, například, jednořetězcové Fvs. Eukaryotické, např. savčí, hostitelské buněčné expresní systémy mohou být použity pro produkci větších protilátkových molekul, včetně kompletních protilátkových molekul. Vhodné savčí hostitelské buňky zahrnují CHO buňky, myelomové nebo hybridomové buňky.

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

Výhodně způsob výroby protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu obsahuje pěstování *E. coli* obsahující *E. coli* expresní vektor obsahující DNA sekvenci podle

předkládaného vynálezu za podmínek vhodných a vedoucích k expresi proteinu a izolaci protilátkové molekuly. Protilátková molekula může být sekretována z buněk nebo cílena do periplazmy vhodnými signálními sekvencemi. Nebo se protilátková molekula může akumulovat v cytoplazmě buňky. Výhodně je protilátková molekula cílena do periplazmy. V závislosti na vytvářené protilátkové molekule a použitém postupu, je žádoucí, aby se protilátková molekula správně prostorově složila („refold“) a přijala funkční konformaci. Postupy umožňující protilátkové molekule, aby se složila, jsou odborníkům dobře známé.

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

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

Předkládaný vynález také poskytuje způsob výroby terapeutického nebo diagnostického přípravku obsahující směs protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným excipientem, ředidlem nebo nosičem.

Protilátková molekula může být jediná aktivní složka v terapeutickém nebo diagnostickém přípravku nebo může být doprovázena další aktivní složkou včetně dalších

protilátkových složek, například protilátek anti-T lymfocyt, anti-IFN γ nebo anti-LP nebo neprotilátkových složek, jako jsou například xantiny.

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

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

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

Dávka, ve které jsou protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu podávány, závisí na povaze léčeného chorobného stavu, na stupni, do kterého vystoupila nebo se očekává, že vystoupila, hladina TNF α , která má být

neutralizována, nad požadovanou úroveň, a na tom, zda protilátková molekula bude použita profylakticky nebo k léčení již existujícího chorobného stavu.

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

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

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

Mohou být použity farmaceuticky přijatelné soli, například soli minerálních kyselin, jako jsou například hydrochloridy, hydrobromidy, fosfáty a sulfáty nebo soli organických kyselin, jako jsou například acetáty, propionáty, malonáty a benzoáty.

Farmaceuticky přijatelné nosiče v terapeutických přípravcích mohou dále obsahovat tekutiny, jako je například voda, fyziologický roztok, glycerol a ethanol. V těchto přípravcích mohou být dále přítomny pomocné látky, jako jsou

například smáčedla nebo emulgátory nebo pH pufrů. Tyto nosiče umožňují, že farmaceutické přípravky jsou formulovány jako tablety, pilulky, dražé, tobolky, tekutiny, gely, sirupy, směsi a suspenze, pro požití pacientem.

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

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

Farmaceutické přípravky tohoto vynálezu mohou být podávány celou řadou způsobů včetně, ale bez omezení, perorálního, intravenózního, intramuskulárního, intraarteriálního, intramedulárního, intrathekálního, intraventrikulárního, transdermálního, transkutánního (viz například, W098/20734), subkutánního, intraperitoneálního, intranazálního, enterálního, topického, sublingválního, intravaginálního nebo rektálního způsobu. Spreje mohou také být použity pro podávání farmaceutických přípravků podle vynálezu. Terapeutické přípravky mohou být typicky připraveny jako přípravky pro injekce, a to buď jako tekuté roztoky nebo suspenze. Mohou být také připraveny pevné látkové formy vhodné pro přípravu roztoku nebo suspenze v tekutém vehikulu před injekcí.

Přímá aplikace přípravku je obecně uskutečňována injekcí, subkutánní, intraperitoneální, intravenózní nebo intramuskulární nebo aplikací do intersticia tkání. Přípravky

může také být podáván na léze. Dávkování léčby může být jednou dávkou nebo podle rozpisu několika dávek.

Je nutné chápat, že aktivní složka v přípravku je protilátková molekula. Jako taková podléhá degradaci v gastrointestinálním traktu. Tedy, jestliže přípravek má být podáván způsobem používajícím gastrointestinální trakt, je zapotřebí, aby přípravek obsahoval činidla, která chrání protilátku před degradací, ale která protilátku uvolní, když byla absorbována z gastrointestinálního traktu.

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

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

Předkládaný vynález také poskytuje protilátkovou molekulu podle předkládaného vynálezu pro léčení nemocí zprostředkovaných $\text{TNF}\alpha$.

Předkládaný vynález dále poskytuje použití protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu pro výrobu léčiva pro léčení nemocí zprostředkovaných $\text{TNF}\alpha$.

Protilátková molekuly podle předkládaného vynálezu může být použita pro jakoukoliv léčbu, kde je žádoucí, aby se snížil stupeň biologicky aktivního $\text{TNF}\alpha$ vyskytujícího se v lidském nebo zvířecím organismu. $\text{TNF}\alpha$ může cirkulovat v organismu nebo se může vyskytovat v nežádoucím vysokém stupni lokalizovaný v konkrétním místě v organismu.

Například zvýšená hladina $\text{TNF}\alpha$ je zapojena do akutních a chronických imunitních a imunoregulačních poruch, infekcí

včetně septického, endotoxického a kardiovaskulárního šoku, zánětlivých onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, maligních nemocí a hepatitidy indukované alkoholem. Detaily o početných chorobách spojených se zvýšenou hladinou $\text{TNF}\alpha$ jsou uvedeny v US-A- 5 919 452. Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může/mohou být použita pro léčbu nemocí zprostředkovaných $\text{TNF}\alpha$. Konkrétní relevantní nemoci, které mohou být léčeny protilátkovou molekulou podle předkládaného vynálezu, jsou sepse, městnavé srdeční selhání, septický nebo endotoxický šok, kachexie, syndrom respirační tísně dospělých, AIDS, alergie, psoriasis, TBC, zánětlivá kostní onemocnění, poruchy krevní koagulace, popáleniny, rejekce po transplantaci orgánů nebo tkání, Crohnova nemoc a autoimunitní onemocnění, jako je například tyreoiditida a revmatoidní artritida a osteoartritida.

Protilátková molekula nebo přípravek mohou být dále použity: aby se snížily vedlejší účinky sdružené s tvořením $\text{TNF}\alpha$ v průběhu terapie neoplastických onemocnění, aby se odstranily nebo snížily symptomy šoku spojené s léčením nebo prevencí rejekce štěpu při použití anti-lymfocytárních protilátek, nebo pro léčení multiorgánového selhání.

Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu je výhodně použita pro léčení revmatoidní artritidy nebo osteoartritidy.

Předkládaný vynález také poskytuje způsob léčení humánních nebo zvířecích pacientů, kteří trpí nebo jsou v riziku onemocnění zprostředkovaného $\text{TNF}\alpha$, tento způsob zahrnuje podávání pacientovi účinného množství protilátkové molekuly podle předkládaného vynálezu.

Protilátková molekula podle předkládaného vynálezu může také být použita pro diagnózu, například pro in vivo diagnózu a znázornění chorobného stavu se zvýšenou hladinou $\text{TNF}\alpha$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Popis obrázků

Předkládaný vynález je pro ilustraci dále popsán v následujících příkladech, které se vztahují k doprovázejícím obrázkům:

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

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

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

Obrázek 4 ukazuje vektor pMR15.1.

Obrázek 5 ukazuje vektor pMR14.

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

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

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

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

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

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

Obrázek 12 ukazuje vektor CTIL5-gL6.

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

Obrázek 14 ukazuje vektor pTTQ9.

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

Obrázek 16 ukazuje vektor pACYC184.

Obrázek 17 ukazuje vektor pTTO-1.

Obrázek 18 ukazuje vektor pTTO-2.

Obrázek 19 ukazuje vektor pDNABEng-G1.

Obrázek 20 ukazuje oligonukleotidové kazety kódující odlišné intergenové sekvence pro expresi modifikovaného Fab v *E. coli* (SEKV. ID. Č. 102 až 105).

Obrázek 21 ukazuje akumulaci modifikovaného Fab IGS variant v periplasmě.

Obrázek 22 ukazuje vektor pTTO(CDP870).

Obrázek 23 ukazuje skóre aktivity nemoci (DAS) u pacientů léčených odlišnými dávkami CDP870 a placebo. Medián a IQ rozmezí jsou uvedeny pro populaci pro každý postup s posledními pokračujícími pozorováními. Malé čtverečky označují placebo, kosočtverce označují 1 mg/kg, trojúhelníky označují 5 mg/kg a velké čtverce označují 20 mg/kg.

Obrázek 24 ukazuje četnost výskytu citlivých kloubů, četnost výskytu oteklých kloubů, skóre bolesti, celkový odhad aktivity nemoci stanovený odhadcem, modifikovaný dotazník k vyhodnocení zdravotního stavu (HAQ), C reaktivní protein (CRP) a rychlost sedimentace červených krvinek (ESR) u pacientů léčených odlišnou dávkou CDP870 a placebem. Medián a IQ rozmezí jsou uvedeny pro populaci pro každý postup s posledními pokračujícími pozorováními. Malé čtverečky označují placebo, kosočtverce označují 1 mg/kg, trojúhelníky označují 5 mg/kg a velké čtverce označují 20 mg/kg.

Příklady provedení vynálezu

Klonování genu a exprese chimérické hTNF40 protilátkové molekuly

Izolace RNA z hTNF40 hybridomových buněk

Celková RNA byla připravena z 3×10^7 hTNF40 hybridomových buněk takto. Buňky byly promyty ve fyziologickém roztoku a rozpuštěny v RNazolu (0,2 ml na 10^6 buněk). Byl přidán chloroform (0,2 ml na 2 ml homogenátu) a směs byla důkladně třepána po dobu 15 sekund, a poté ponechána na ledu po dobu 15 minut. Výsledná vodná a organická fáze byly odděleny centrifugací po dobu 15 minut v Eppendorfově centrifuze a RNA

byla precipitována z vodné fáze přidáním stejného objemu isopropanolu. Po 15 minutách na ledu byla RNA stočena do peletu, promyta 70% ethanolem, usušena a rozpuštěna ve sterilní vodě bez RNázy. Výtěžek RNA byl 400 µg.

PCR klonování hTNF40 Vh a Vl

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

a) syntéza cdNA

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

b) PCR

Alikvoty cdNA byly podrobeny PCR s použitím kombinace primerů specifických pro těžké a lehké řetězce. Nukleotidové sekvence 5' primerů pro těžké a lehké řetězce jsou ukázány v tabulce 1 a 2, v daném pořadí. Tyto sekvence všechny obsahují postupně restriční místo začínající 7 nukleotidů od jejich 5' konců, sekvenci GCCGCCACC (SEKV. ID. Č. 12) pro umožnění optimální translace výsledných mRNA, iniciační kodon a 20-30 nukleotidů založených na vedoucí peptidové sekvenci

známých myších protilátek (Kabat a kol., Sequences of proteins of immunological interest, 5. vydání, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

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

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

Inkubace (100 μ l) pro PCR byly nastaveny takto. Každá reakce obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01 % (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 10 pmol směsi 5' primerů (tabulka 4), 10 pmol 3' primeru (CL12 (lehký řetězec) nebo R2155 (těžký řetězec) (tabulka 3), 1 μ l cDNA a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly inkubovány v 95°C po dobu 5 minut a poté podrobeny cyklům v 94°C po dobu 1 minuty, 55°C po dobu 1 minuty a 72°C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byl alikvot z každé reakce analyzován elektroforézou na agarózovém gelu. Reakce pro lehké řetězce obsahující směsi 5' primerů ze skupin pro lehké řetězce 1, 2 a 7 vytvořily pásy o velikostech souhlasných s kompletními V1 fragmenty, zatímco reakce ze skupin pro těžké řetězce 3 vytvořily fragment o velikosti očekávaného Vh genu. Pás vytvořený primery ze skupiny pro

lehké řetězce 1 nebyl dále sledován, protože předběžné výsledky ukázaly, že tento pás odpovídá pseudogenu lehkého řetězce tvořeného hybridomovými buňkami. Pás vytvořený primery ze skupiny pro lehké řetězce 7 byl slabší než pás primerů ze skupiny 2, a tudíž nebyl dále sledován. Pouze pás vytvořený primery ze skupiny pro lehké řetězce 2, což byl nejsilnější pás, byl dále sledován.

c) Molekulární klonování PCR fragmentů

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

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

d) Analýza sekvencováním nukleotidů

Plazmidová DNA z velkého počtu izolátů obsahujících Vh inzerty byla sekvencována s použitím primerů R1053 (viz tabulka 5) (které nasedají v 3' úseku HCMV promotoru v pMR14) a R720 (viz tabulka 5) (které nasedají v 5' úseku humánního C - gama 4 a umožňují sekvencování přes DNA inzert v pMR14). Bylo

zjištěno, že nukleotidové sekvence Vh inzertu ve velkém počtu klonů byly totožné, s výjimkou rozdílů v signálním peptidu a J úsecích. To ukazovalo, že vyšetřené klony jsou nezávislé izoláty vznikající použitím odlišných primerů ze směsi oligonukleotidů v průběhu PCR stádia. Zjištěné nukleotidové sekvence a předpovězené aminokyselinové sekvence variabilní domény těžkého řetězce protilátky hTNF40 (hTNF40Vh) jsou uvedeny na obrázku 7 (SEKV. ID. Č. 100).

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

Tabulka 1

Oligonukleotidové primery pro 5' úsek myších těžkých řetězců.

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

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

CH3: 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAACTGGGTTTT3' (SEKV. ID. Č. 15)

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

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

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

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

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

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

CH10: 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT3' (SEKV. ID. Č. 22)

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

CH12: 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEKV. ID. Č. 24)

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

Tabulka 2

Oligonukleotidové primery pro 5' úsek myších lehkých řetězců.

CL1: 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEKV. ID. Č. 26)

CL2: 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEKV. ID. Č. 27)

CL3: 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEKV. ID. Č. 28)

CL4: 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEKV. ID. Č. 29)

CL5: 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEKV. ID. Č. 30)

CL5A: 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEKV. ID. Č. 31)

CL6:

5'ATGAGGT(T,G)C(T,C)(T,C)TG(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)CTG(A,G)G3'
(SEKV. ID. Č. 32)

CL7: 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEKV. ID. Č. 33)

CL8:

5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3' (SEKV. ID. Č. 34)

CL9: 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEKV. ID. Č. 35)

CL10: 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTTC3' (SEKV. ID. Č. 36)

CL11: 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3' (SEKV. ID. Č. 37)

CL12A: 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEKV. ID. Č. 38)

CL12B: 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEKV. ID. Č. 39)

CL13: 5'ATGGATTACAGGCCCCAGGTTCT'TAT3' (SEKV. ID. Č. 40)

CL14: 5'ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEKV. ID. Č. 41)

CL15: 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEKV. ID. Č. 42)

CL16: 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEKV. ID. Č. 43)

CL17A: 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEKV. ID. Č. 44)

CL17B: 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEKV. ID. Č. 45)

CL17C: 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEKV. ID. Č. 46)

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

Tabulka 3

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

Lehký řetězec (CL12):

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

Těžký řetězec (R2155):

5' GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA3' (SEKV. ID. Č. 49)

Tabulka 4

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

skupina 1: CL2.

skupina 2: CL7.

skupina 3: CL13.

skupina 4: CL6.

skupina 5: CL5A, CL9, CL17A.

skupina 6: CL8.

skupina 7: CL12A.

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

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

skupina 1: CH1, CH2, CH3, CH4.

skupina 2: CH5, CH6, CH7, CH8.

skupina 3: CH9, CH10, CH11, CH12.

Tabulka 5

Primery použité pro analýzu sekvencováním nukleotidů

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

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

Hodnocení aktivity chimérických genů

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

a) Produkce chimérické hTNF40 protilátkové molekuly

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

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

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

b) ELISA

Pro provádění testu ELISA byly destičky Nunc ELISA potaženy přes noc ve 4°C s F(ab)_2 fragmentem anti-humánní polyklonální kozí protilátky specifické pro Fc fragment (Jackson Imunovýzkum, kóduj 109-006-098) v 5 $\mu\text{g/ml}$ ve vazebném pufru (15 mM uhličitán sodný, 35 mM hydrouhličitán sodný, pH 6,9). Nenavázaná protilátka byla odstraněna promytím 5 krát destilovanou vodou. Vzorky a purifikované standardy, které

měly být kvantifikovány, byly naředěny přibližně na 1 µg/ml v konjugačním pufru (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,1 M NaCl, 0,2% (objem/objem) Tween 20, 0,2% (hmotnost/objem) Hammerstenův kasein). Vzorky byly titrovány v mikrotitračních jamkách ve dvojkových ředěních za vzniku konečného objemu 0,1 ml v každé jamce a destičky byly inkubovány při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny s třepáním. Po prvním inkubačním kroku byly destičky promyty 10 krát destilovanou vodou, a poté inkubovány po dobu 1 hodiny jako předtím s 0,1 ml myší anti-humánní kappa monoklonální protilátkou (klon GD12) konjugovanou s peroxidázou (The Binding Site, katalog. č. MP135) v ředění 1 k 700 v konjugačním pufru. Destička byla opět promyta a do každé jamky byl přidán roztok substrátu (0,1 ml). Roztok substrátu obsahoval 150 µl N,N,N,N-tetramethylbenzidin (10 mg/ml v DMSO), 150 µl peroxid vodíku (30% roztok) v 10 ml 0,1 M acetát sodný/ citrát sodný, pH 6,0. Destičky byly vyvolávány po dobu 5-10 minut, dokud nebyla absorbance v 630 nm přibližně 1,0 pro horní standard. Absorbance v 630 nm byla měřena s použitím přístroje pro odečítání mikrotitračních destiček a koncentrace vzorku stanovena srovnáním titrační křivky s křivkou standardu.

c) stanovení afinitních konstant analýzou BiaCore

Vazebné interakce mezi hTNF40 a humánním TNF byly zkoumány s použitím technologie BIA. Afinitně purifikovaná koží polyklonální protilátka, namířená proti konstantnímu úseku hTNF40, byla imobilizována na dextranový polymer povrchu sensorického čipu s použitím standardní NHS/EDC chemie. Relativně nízké množství (200-500 RU) hTNF40 bylo zachyceno, aby bylo zajištěno, že byly minimalizovány účinky hmotového transportu. Přes zachycenou hTNF40 „protékal“ humánní TNF v různých koncentracích, aby bylo možné stanovit asociační

kinetiku. Po injekci ligandu přecházel přes povrch pufr, aby bylo možné měřit disociaci. Byly vypočteny konstanty rychlosti asociace a disociace pro interakce mezi hTNF40 na pevné fázi a humánním TNF a byla určena hodnota K_D .

Příklad 1

CDR-roubování hTNF40

Molekulární klonování genů pro variabilní úseky těžkých a lehkých řetězců hTNF40 protilátky a jejich použití pro produkci chimérických (myší-humánní) hTNF40 protilátek bylo popsáno výše. Nukleotidové a aminokyselinové sekvence myších hTNF40 V1 a Vh jsou ukázány na obrázku 6 a 7 (SEKV. ID. Č. 99 a 100), v daném pořadí. Tyto příklady popisují CDR-roubování hTNF40 protilátky.

CDR-roubování hTNF40 lehkého řetězce

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

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

z hTNF40 lehkého řetěz, zatímco ve druhé, hTNF40-gL2 (SEKV. ID. Č. 9), všechny zbytky jsou humánní kanonické kromě zbytku č. 60, který je z hTNF40 lehkého řetězce.

Konstrukce CDR-roubovan lehkého řetězce hTNF40-gL1

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

oligo 1 P7982:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTACTAAC
GTAGCCTGGTATCAGCAAA3' (SEKV. ID. Č. 52)

oligo 2 P7983:

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

oligo 3 P7984:

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

oligo 4 P7985:

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

oligo 5 P7986:

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

Fwd P7981:

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

Bwd P7980

5' GAATTCCGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT3' (SEKV. ID. Č. 58),

PCR reakce v objemu 100 μ l obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 pmol P7980, P7981 a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94°C po dobu 1 minuty, 55°C po dobu 1 minuty a 72°C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla každá reakce analyzována elektroforézou na agarózovém gelu a PCR fragment byl z gelu vyříznut a znovu získán s použitím soupravy Mermaid Kit. Získaný fragment byl štěpen enzymy BstEII a SplI v příslušném pufru. Výsledný produkt byl nakonec podroben elektroforéze na agarózovém gelu a z gelového řezu byl opět získán DNA fragment o velikosti 270 párů bazí a byl ligován do vektoru CTIL5-gL6 (obrázek 12), který byl dříve štěpen stejným enzymem. Výše uvedený vektor poskytuje chybějící protilátkovou vedoucí sekvenci a prvních 17 aminokyselin rámce 1.

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

Konstrukce CDR-roubovaného lehkého řetězce hTNF40-gL2

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

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

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

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

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

Dvě reakce, každá po 20 μ l, obsahovaly po 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 0,1 μ g hTNF40-gL1, 6 pmol R1053/R5350 nebo R5349/R684 a 0,25 jednotky Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94°C po dobu 1 minuty, 55°C po dobu 1 minuty a 72°C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla každá reakce analyzována elektroforézou na agarózovém gelu a PCR fragment byl z gelu vyříznut a znovu získán s použitím soupravy Mermaid Kit.

Alikvoty těchto reakcí byly poté podrobeny druhému kolu PCR. Reakce 100 μ l obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01 % (hmotnost/objem) želatiny, 1/5 každého PCR fragmentu z první sady reakcí, 30 pmol R1053 a R684 a 2,5 jednotky Taq polymerázy. Reakční teploty byly uvedeny výše. Po PCR byla směs extrahována směsí fenolu a chloroformu, a poté chloroformem a precipitována ethanolem. Ethanolový precipitát byl znovu získán centrifugací, rozpuštěn v příslušném pufru a štěpen enzymy BstEII a SplI. Výsledný produkt byl nakonec podroben elektroforéze na agarózovém gelu a z gelového řezu byl opět získán DNA fragment o velikosti 20 párů bazí a byl ligován do vektoru pMR15.1 (obrázek 4), který byl dříve štěpen stejným enzymem.

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

CDR-roubování hTNF40 těžkého řetězce

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

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

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

Konstrukce CDR-roubovaného těžkého řetězce ghlhTNF40.4

ghlhTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 1,0) byla sestavena pomocí překrývajících se oligonukleotidů metodou PCR v přítomnosti příslušných primerů. V PCR byly použity následující oligonukleotidy:

Roub skupiny 1

oligo 1 P7989:

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

oligo 2 P7990:

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

oligo 3 P7991:

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

oligo 4 P7995:

5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT
TGACGACTTCAAGGCGAGATTCACGTTC3' (SEKV. ID. Č. 66)

oligo 5 P7992:

5' CCATGTATGCAGTGC GTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTTGAA3'
(SEKV. ID. Č. 67)

oligo 6 P7993:

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

oligo 7 P7994:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEKV. ID. Č. 69)

Fwd: P7988:

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

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

100 μ l reakce obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol každého z p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 a p7994, 10 pmol každého z p7988 a p7987 a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94°C po dobu 1 minuty, 55°C po dobu 1 minuty a 72°C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla reakce extrahována směsí fenolu a chloroformu (1/1), poté chloroformem a precipitována ethanolem. Po centrifugaci byla DNA rozpuštěna v příslušném restričním pufru a štěpena ApaLI a KpnI. Výsledný fragment byl izolován z agarózového gelu a ligován do pMR14 (obrázek 5), který byl dříve štěpen stejným enzymem. pMR14 obsahují humánní gama 4 konstantní úseky těžkého řetězce. Když pMR14 je štěpen ApaLI a KpnI, naštěpený vektor je schopný přijmout štěpenou DNA tak, že 3' konec štěpené DNA se ve čtecím rámci spojí s 5' koncem sekvence kódující konstantní úsek gama 4. Tudiž těžký řetězec exprimovaný tímto vektorem má izotyp gama 4. Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* LM1035 a výsledné bakteriální kolonie byly podrobeny screeningu restričním štěpením a analýze nukleotidovým sekvencováním. Takto byl identifikován plazmid obsahující správnou sekvenci pro ghlhTNF40.4 (obrázek 10) (SEKV. ID. Č. 10).

Konstrukce CDR-roubovaného těžkého řetězce gh3hTNF40.4

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

Roub skupiny 3

oligo 1 P7999:

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

oligo 2 P8000:

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

oligo 3 P8001:

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

oligo 4 P7995:

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

oligo 5 P7997:

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

oligo 6 P7998:

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

oligo 7 P7993:

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

Fwd P7996:

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

Bwd P7987:

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

100 μ l reakce obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01% (hmotnost/objem) želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosidtrifosfátu, 2 pmol každého z p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 a p7993, 10 pmol každý p7996 a p7987 a 1 jednotku Taq polymerázy. Reakce byly podrobeny cyklům v 94°C po dobu 1 minuty, 55°C po dobu 1 minuty a 72°C po dobu 1 minuty. Po 30 cyklech byla reakce extrahována směsí fenolu a chloroformu (1/1), poté chloroformem a precipitována ethanolem. Po centrifugaci byla DNA rozpuštěna v příslušném restrikním pufru a štěpena ApaI a KpnI. Výsledný fragment byl izolován z agarózového gelu a ligován do pMR14 (obrázek 5), který byl dříve štěpen stejným enzymem. pMR14 obsahují humánní gama 4 konstantní úseky těžkého řetězce. Když pMR14 je štěpen ApaI a KpnI, naštěpený vektor je schopný přijmout štěpenou DNA tak, že 3' konec štěpené DNA se ve čtecím rámci spojí s 5' koncem sekvence kódující konstantní úsek gama 4. Tudíž těžký řetězec exprimovaný tímto vektorem má izotyp gama 4. Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* LM1035 a výsledné bakteriální kolonie byly podrobeny screeningu restrikním štěpením a analýze nukleotidovým sekvencováním. Takto byl identifikován plazmid obsahující správnou sekvenci pro gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11) (obrázek 11).

Produkce CDR-roubovaného modifikovaného Fab Fragmentu

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

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

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

Materiál a metody

Techniky DNA

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

Indukce v třepaných baňkách

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

Periplazmatická extrakce

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

Test sestavení

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

Konstrukce plazmidu pTTO-1

(a) nahrazení pTTQ9 polylinkeru

Plazmid pTTQ9 byl získán od firmy Amersham a je ukázán na obrázku 14. Alikvot (2 µg) byl štěpen restričními enzymy Sali a EcoRI, štěpný produkt byl puštěn na 1% agarózovém gelu a velký DNA fragment (4520 bp) byl purifikován. Byly syntetizovány dva oligonukleotidy, které po společném nasednutí kódují úsek OmpA polylinkeru ukázaný na obrázku 15. Tato sekvence má kohezivní konce, které jsou kompatibilní se Sali a EcoRI konci vytvořenými restrikcí pTTQ9. Klonováním této oligonukleotidové 'kazety' do pTTQ9 vektoru nebylo regenerováno místo Sali, ale místo EcoRI bylo udrženo. Kazeta

kóduje prvních 13 aminokyselin signální sekvence *E. coli* proteinu Omp-A vnější membrány, předcházených Shine-Dalgarno vazebným místem pro ribozom OmpA genu. Kromě toho jsou přítomna restriční místa pro enzymy XbaI, MunI, StyI a SplI. MunI a StyI místa jsou v kódujícím úseku OmpA signální sekvence a jsou zamýšlena jako 5' klonovací místa pro inzerci genů. Dva oligonukleotidy, které vytváří tuto kazetu, byly spojeny dohromady smícháním v koncentraci 5 pmol/ μ l a zahříváním ve vodní lázni na 95 °C po dobu 3 minut, a poté pomalým ochlazením na teplotu místnosti. Spojená sekvence pak byla ligována do pTTQ9 štěpeného SalI/EcoRI. Výsledný plazmidový meziprodukt, nazvaný pTQOmp, byl ověřen pomocí DNA sekvencování.

(b) Příprava a ligace fragmentu

Plazmid pTTO-1 byl konstruován ligací jednoho DNA fragmentu z plazmidu pACYC184 ke dvěma fragmentům vytvořeným z pTQOmp. Plazmid pACYC184 byl získán od firmy New England Biolabs a restriční mapa je ukázána na obrázku 16. Alikvot (2 μ g) byl štěpen do úplnosti restričním enzymem StyI, a pak podroben působení nukleázy z fazolí mungo, což vytvořilo slepé konce odstrizením 5' báze přesahů. Po fenolové extrakci a ethanolové precipitaci byla DNA štěpena enzymem PvuII, za vytvoření fragmentů o velikosti 2348, 1081, 412 a 403 bp. fragment o velikosti 2348 bp byl purifikován po elektroforéze na agarózovém gelu. Tento fragment kóduje marker rezistence na tetracyklin a p15A počátek replikace. Fragment pak byl podroben působení alkalické fosfatázy z telecího střeva, aby se odstranily 5' koncové fosfáty, a tím se této molekule zabránilo v ligaci sama k sobě.

Alikvot (2 μ g) plazmidu pTQOmp byl štěpen enzymem SspI a EcoRI a fragment o velikosti 2350 bp byl purifikován

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

Tři fragmenty byly poté ligovány s použitím přibližně ekvimolárního množství každého fragmentu za vzniku plazmidu pTTO-1. Všechna klonovací spojení byla ověřena pomocí DNA sekvencování. Restrikční mapa tohoto plazmidu je ukázána na obrázku 17. Plazmid pTTO-2 byl pak vytvořen inzercí DNA kódující konstantní doménu lehkého řetězce kappa humánního Ig. Ta byla získána jako *SplI* - *EcoRI* restrikční fragment z plazmidu pHCl32 a vložena na odpovídající místa v pTTO-1. Plazmid pTTO-2 je ukázán na obrázku 18.

Inzerce humanizovaných hTNF40 variabilních úseků do pTTO-2

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

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

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

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

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

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

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

Po PCR byl produkt purifikován, štěpen enzymy NheI a ApaI, a poté byl subklonován do vektoru pDNAbEng-G1 (obrázek 19). Po ověření pomocí DNA sekvencování byl těžký řetězec štěpen enzymem EcoRI a subklonován do EcoRI místa v pTTO(hTNF40L) za vzniku *E. coli* expresního plazmidu pTTO(hTNF40).

Optimalizace intergenové sekvence pro expresi modifikovaného Fab

Ve vektoru pTTO nastává exprese modifikovaného Fab z dicistronické RNA kódující nejdříve lehký řetězec, a poté těžký řetězec. DNA sekvence mezi těmito dvěma geny (intergenová sekvence, IGS) může ovlivnit stupeň exprese těžkého řetězce působením na rychlost iniciace translace. Například krátká intergenová sekvence může mít za následek translační spojení mezi lehkými a těžkými řetězci, ve kterém translační ribozom nemusí plně disociovat z mRNA po ukončení syntézy lehkého řetězce před iniciací syntézy těžkého řetěz. „Síla“ jakéhokoliv vazebného Shine-Dalgarnova (SD) místa ribozomu (homologie s 16 rRNA) může mít také vliv, stejně jako vzdálenost a složení sekvence mezi SD a ATG startovacím kodonem. Potenciální sekundární struktura mRNA kolem ATG je další důležitý faktor, ATG by měl být v „kličce“ a ne stísněný v „stonku“, zatímco pro SD to platí opačně. Tak modifikací složení a délky IGS je možné modifikovat sílu iniciace

translace, a tudíž stupeň produkce těžkého řetěz. Je pravděpodobné, že pro maximalizaci exprese těžkého řetězce daného modifikovaného Fab je nutné dosáhnout optimální rychlosti iniciace translace. Například, pro jeden modifikovaný Fab může být tolerován vysoký stupeň exprese, ale pro odlišný modifikovaný Fab s odlišnou aminokyselinovou sekvencí se ukáže vysoký stupeň exprese jako toxický, možná pro odlišnou účinnost sekrece nebo skládání. Z tohoto důvodu byly navrženy série čtyř intergenových sekvencí (obrázek 20) umožňujících empirické stanovení optimálních IGS pro modifikovaný Fab založený na hTNF40. IGS1 a IGS2 mají velmi krátké intergenové sekvence (-1 a +1, v daném pořadí) a je možné očekávat vznik těsně spojené translace, SD sekvence (podtrženo) jsou slabě odlišné. Tyto dvě sekvence s největší pravděpodobností propůjčují vysoký stupeň iniciace translace. IGS3 a IGS4 mají delší vzdálenost mezi startovacím kodonem a stop kodonem (+13) a liší se ve složení svých sekvencí, IGS3 má „silnější“ SD sekvence. Všechny sekvence byly studované na výskyt sekundární struktury (s použitím programu m/fold) a „optimalizovány“ co možná nejvíce, ale, při těsném spojení translace dvou řetězců chybění ribozomální disociace znamená, že mRNA nemusí být „nahá“, aby se zabránilo vytvoření sekundární struktury.

Klonování IGS variant

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

expresní plazmidy pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS-4).

Expresní analýza při kultivaci v třepaných baňkách

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

propůjčená IGS3 má za následek lepší růstové charakteristiky a proto v průběhu času akumuluje lepší výtěžek.

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

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

PEGylace CDR-roubovaného, modifikovaného Fab založeného na hTNF40

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

Účinnost PEGylovaného CDR-roubovaného modifikovaného Fab založeného na hTNF40 (CDP870) v léčbě revmatoidní artritidy

CDP870 má biologický poločas dlouhý přibližně 11 dnů.

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

Metody

Pacienti:

Pacienti ve věku mezi 18 a 75 lety a ti, kteří splnili diagnostická kritéria pro revmatoidní artritidu (RA) revidovaná v roce 1987 American College Rheumatology (ACR) (Arnett al., Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988) byli získáváni z ambulance revmatologické kliniky v Londýně,

Cambridgi, Norfolku a Norwichi (Spojené království). Byli požadováni pacienti, kteří měli klinicky aktivní nemoc, což bylo definováno tak, že měli alespoň 3 z následujících kritérií: ≥ 6 bolestivých nebo citlivých kloubů, ≥ 45 minut trvající ranní ztuhlost a rychlost sedimentace červených krvinek (ESR) ≥ 28 mm/hodinu. Pacienti dále nereagovali na léčbu alespoň jedním lékem modifikujícím průběh revmatických nemocí (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug - DMARD) a byli bez léčby po dobu nejméně 4 týdnů. Užívání kortikosteroidů bylo povoleno, jestliže dávka byla $\geq 7,5$ mg/den prednisolonu. Těhotné ženy, kojící ženy a ženy ve fertilním věku neužívající účinnou metodu kontracepce byly vyloučeny. Pacienti byly také vyloučeni, jestliže měli v anamnéze malignitu, současné závažné nekontrolované chorobné stavy, předešlou terapii neutralizující $\text{TNF}\alpha$, která selhala, nebo alergii na polyethylenglykol. Před zapsáním do studie byl od každého pacienta získán psaný souhlas. Studie byla schválena místní etickou komisí pro vědu.

Léčebný protokol:

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

Klinické vyhodnocení:

Aktivita RA byla hodnocena na základě kritérií World Health Organization a International League of Associations for

Rheumatology (Boers a kol., J. Rheumatol., Supplement, 41, 86-89, 1994) a European League Against Rheumatism (EULAR) (Scott a kol., Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) s hodnocením souboru dat získaných z 28 kloubů. Změny v aktivitě nemoc byly hodnoceny pomocí stupnice pro aktivitu nemoci (Prevoo a kol., Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) a kritérií ACR (Felson a kol., Arthritis Rheum., 38, 727-735, 1995). Hodnocení se provádělo před léčbou a 1, 2, 4, 6 a 8 týdnů po léčbě. U pacientů byla také hodnocena bezpečnost a tolerance studovaného léčiva. Při každé vizitě byly hodnoceny hematologické a biochemické parametry a anti-CDP870 protilátky a vedlejší účinky.

Plazmatická koncentrace CDP870 a anti-CDP870 protilátek

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

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

Statistická analýza

Studie měla výzkumný charakter a velikost vzorku byla založena na předešlé zkušenosti s podobnými přípravky.

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

Výsledky

Demografická situace:

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

Tabulka 6

Demografické detaily (průměr ± standardní odchylka)

	Počet	Pohlaví (M:Ž)	Věk	Trvání nemoci	Revmatoidní faktor	Počet dřívějších DMARD
Placebo	12	1:11	51±8	12±8	8 (67%)	5±1
1 mg/kg	8	1:7	59±7	12±7	4 (0%)	4±1
5 mg/kg	8	2:6	54±13	13±5	5 (63%)	5±2
20 mg/kg	8	2:6	61±11	14±13	4 (50%)	4±2

Klinická účinnost:

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

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

Výskyt vedlejších účinků

Léčba byla dobře snášena bez reakcí spojených s podáváním infúze. Nebyla hlášena žádná alergická reakce nebo kožní

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

Plazmatická koncentrace CDP870 a hladina anti-CDP870

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

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

Diskuse

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

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

protilátky (Rankin a kol., (výše)) a mnohem déle než biologický poločas nekonjugovaných Fab' fragmentů. Dále CDP870 vyvolala pouze velmi nízké hladiny stupeň protilátkové reakce.

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

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

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

SEZNAM SEKVENCIÍ

<160> 115

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

hTNF40 CDRH1

<400> 1

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

hTNF40/Humánní hybrid

CDRH2

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

hTNF40 CDRH3

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

06.03.02

64

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL1

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

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL2

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

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 CDRL3

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

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

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

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

Gly

<210> 8

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

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

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

<400> 8
 gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc ctg agc gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 gta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa gcc ctc atc 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga 192
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc acg atc agt agc ctc cag cca 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95
 aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

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

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

<400> 9
 gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc ctg agc gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 10

<211> 354

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

gh1hTNF40.4 (Figure 10)

<400> 10

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

tcc gtc aaa gtt tgc tgt aag gcc tca ggc tac gtg ttc aca gac tat	96	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30

ggt atg aat tgg gtc aga cag gcc ccg gga caa ggc ctg gaa tgg atg	144	
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45

ggt tgg att aat act tac att gga gag cct att tat gct caa aag ttc	192	
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60

```

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

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

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

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

```

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

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

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

```

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

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

gga atg aat tgg gtt aga cag gcc ccg gga aag ggc ctg gaa tgg atg 144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35                40                45

ggt tgg att aat act tac att gga gag cct att tat gct gac agc gtc 192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60

aag ggc aga ttc acg ttc tct cta gac aca tcc aag tca aca gca tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
      65                70                75                80

ctc caa atg aat agc ctg aga gca gag gac acc gca gtg tac tat tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95

gct aga gga tac aga tct tat gcc atg gac tac tgg ggc cag ggt acc 336

```

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

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

354

<210> 12
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: Část sekvence primeru

<400> 12
 gccgccacc

9

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH1

<400> 13
 atgaaatgca gctgggtcat sttctt

26

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH2

<400> 14
 atgggatgga gctrtatcat sytctt

26

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

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: primer CH3

<400> 15
 atgaagwtgt ggtaaactg ggtttt

26

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer CH4

<400> 16
atgractttg ggytcagctt grt

23

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer CH5

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agtttt

26

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer CH6

<400> 18
atggctgtcy trgsgctrct cttctg

26

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer CH7

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tmtctt

25

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

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer CH8

<400> 20

atgagagtgc tgattctttt gtg

23

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH9

<400> 21

atggmttggg tgtggamctt gctatt

26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH10

<400> 22

atgggcagac ttacattctc attcct

26

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH11

<400> 23

atggattttg ggctgatttt ttttattg

28

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CH12

<400> 24

atgatggtgt taagtcttct gtacct

26

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer 5' end

<400> 25

gcgcgcaagc ttgccgccac c

21

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL1

<400> 26

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct

29

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL2

<400> 27

atggagwcag acacactcct gytatgggt

29

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL3

<400> 28

atgagtgtgc tcactcaggt cct

23

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL4

<400> 29

atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg

26

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL5

<400> 30

atggatttwc aggtgcagat twtcagctt

29

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

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

<400> 31
atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

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

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

<400> 32
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

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

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

<400> 33
atgggcwtca agatggagtc aca 23

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer CL8

<400> 34
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer CL9

<400> 35
atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 36
<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL10

<400> 36

atgtatatat gtttgttgtc tatttc

26

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL11

<400> 37

atggaagccc cagctcagct tctctt

26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL12A

<400> 38

atgragtywc agaccaggt ctttyrt

26

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL12B

<400> 39

atggagacac attctcaggt ctttgt

26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL13

<400> 40

atggattcac aggcccaggt tcttat

26

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL14

<400> 41

atgatgagtc ctgcccagtt cctggt

26

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL15

<400> 42

atgaatttgc ctgttcatct cttggtgct

29

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL16

<400> 43

atggattttc aattggtcct catctcctt

29

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL17A

<400> 44

atgaggtgcc tarctsagtt cctgrg

26

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer CL17B

<400> 45

atgaagtact ctgctcagtt tctagg

26

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

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

<400> 46
atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

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

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

<400> 47
ggactgttcg aagccgccac c 21

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer CL12

<400> 48
ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt 30

<210> 49
<211> 37
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer R2155

<400> 49
gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrgag acdgtga 37

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer R1053

<400> 50
gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: primer R720

<400> 51
gctctcggag gtgctcct

18

<210> 52
<211> 70
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7982

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

<210> 53
<211> 71
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7983

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

<210> 54
<211> 71
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7984

<400> 54
tacagtgcct ctttcctcta tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cggtagtgg 60
actgatttca c 71

<210> 55
<211> 71
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7985

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

<210> 56
<211> 89
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7986

<400> 56

atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggtgta 60
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7981

<400> 57

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

P7980

<400> 58

gaattccgta cgtttgattt ctacttttagt 30

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

R1053

<400> 59

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60

<211> 57

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

R5350

<400> 60

tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

R5349

<400> 61

gcagatggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

R684

<400> 62

ttcaactgct catcagat

18

<210> 63

<211> 65

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7989

<400> 63

gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60
aattc 65

<210> 64

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7990

<400> 64

ggttaagaag cctggtgctt ccgtcaaagt ttctgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60
agactatggt a 71

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7991

<400> 65

ccaacccatc catttcaggc cttgtcccgg ggcttgcttg acccaattca taccatagtc 60
tgtgaacacg t 71

<210> 66

<211> 81

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7995

<400> 66

ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcacgtt c 81

<210> 67

<211> 56

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7992

<400> 67

ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7993

<400> 68

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 69

<211> 78

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7994

<400> 69

gaattcggtg ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:

primer P7988

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7987

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

<210> 72

<211> 65

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7999

<400> 72

gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60
aattc 65

<210> 73

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P8000

<400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtocgtgtgct gcatctgggtt acgtcttcac 60
agactatgga a 71

<210> 74

<211> 71

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P8001

<400> 74

ccaacccatc catttcaggc cctttcccg ggccgtgctta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75

<211> 55

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7997

<400> 75

ggaggtatgc tggtgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7998

<400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 77

<211> 78

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7993

<400> 77

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer P7996

<400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctgggc 30

<210> 79

<211> 74

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: 5' primer

<400> 79

cgcgcgga aa ttgcagtggc ctgggctggg ttgctaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60
atgacccaga gcc 74

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: 3' primer

<400> 80

ttcaactgct catcagatgg 20

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

<220>

<223> Popis umělé sekvence: 5' primer

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

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

<220>

<223> Popis umělé sekvence: 3' primer

<400> 82
 gcctgagttc cacgacac 18

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

<220>

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

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 84
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec L1

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 20

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

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

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

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec L2

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

<210> 87
 <211> 32
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

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

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

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec L3

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

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

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence
 L4 rámce skupiny 1

<400> 89

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

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček L4

<400> 90

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

<210> 91

<211> 30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence
 H1 rámce skupiny 1

<400> 91

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

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

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček H1

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence
 H2 rámce skupiny 1

<400> 93

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

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámec H2

<400> 94

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

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence
 H3 rámce skupiny 1

<400> 95

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

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

<210> 96

<211> 32
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček H3

<400> 96

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

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

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní kanonická sekvence
 H4 rámeček skupiny 1

<400> 97

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

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: hTNF40 rámeček H4

<400> 98

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

<210> 99

<211> 324

<212> DNA

<213> myš

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> variabilní doména lehkého řetězce myši hTNF40

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

<210> 100

<211> 354

<212> DNA

<213> myš

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223> variabilní doména těžkého řetězce myši hTNF40

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 101

<211> 84

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> CDS

<222> (29)..(67)

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotidový adaptor OmpA

<400> 101

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

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

<210> 102

<211> 67

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(40)

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(66)

<220>

<223> Popis umělé sekvence: IGS kazeta-1

<400> 102

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

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

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

<210> 103
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

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

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

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: IGS kazeta-2

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

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

<210> 104
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

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

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

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: IGS kazeta-3

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

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

15

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 107

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

<210> 108

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

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

<400> 108

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

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

<400> 109

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

<210> 110

<211> 648

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný těžký řetězec pro Fab

<400> 110

gaggttcagc	tggtcgagtc	aggaggcggc	ctcgtgcagc	ctggcggatc	actgagattg	60
tcctgtgctg	catctgggta	cgtcttcaca	gactatggaa	tgaattgggt	tagacaggcc	120
ccgggaaagg	gcctggaatg	gatgggttgg	attaatactt	acattggaga	gcctatttat	180
gctgacagcg	tcaagggcag	attcacgttc	tctctagaca	catccaagtc	aacagcatac	240
ctccaaatga	atagcctgag	agcagaggac	accgcagtg	actattgtgc	tagaggatac	300
agatcttatg	ccatggacta	ctggggccag	ggtaccctag	tcacagtctc	ctcagcttcc	360
accaagggcc	catcggtctt	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctggg	caaggactac	ttccccgaac	cgggtgacgg	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggg	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt

648

<210> 111

<211> 216

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný těžký řetězec pro Fab

<400> 111

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215

<210> 112

<211> 642

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný lehký řetězec pro Fab a modifikovaný Fab

<400> 112

```

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

```

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný lehký řetězec pro Fab a modifikovaný Fab

<400> 113

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

165

170

175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 114

<211> 687

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný těžký řetězec pro modifikovaný Fab

<400> 114

gaggttcagc	tggtcgagtc	aggaggcggt	ctcgtgcagc	ctggcggtac	actgagattg	60
tctgtgctg	catctgggta	cgtcttcaca	gactatggaa	tgaattgggt	tagacaggcc	120
cgggaaaagg	gcctggaatg	gatgggttgg	attaatactt	acattggaga	gcctatttat	180
gctgacagcg	tcaagggcag	attcacgttc	tctctagaca	catccaagtc	aacagcatac	240
ctccaaatga	atagcctgag	agcagaggac	accgcagtgt	actattgtgc	tagaggatac	300
agatcttatg	cctatggacta	ctggggccag	ggtaccctag	tcacagtctc	ctcagcttcc	360
accaagggcc	catcggtctt	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctggg	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggg	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtcgaca	agaaagtga	gccccaatct	660
tgtgacaaaa	ctcacacatg	cgccgcg				687

<210> 115

<211> 229

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Roubovaný těžký řetězec pro modifikovaný Fab

<400> 115

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

05.03.02

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Ala Ala
225

05.03.02

PV402-837

18019

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která obsahuje těžký řetězec, ve kterém variabilní doména obsahuje CDR mající sekvenci uvedenou jako H1 na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 1) pro CDRH1, H2' na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 2) nebo H2' na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 7) pro CDRH2 nebo H3 na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 3) pro CDRH3.
2. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která obsahuje lehký řetězec, ve kterém variabilní doména obsahuje CDR mající sekvenci uvedenou jako L1 na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 4) pro CDRL1, L2 na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 5) pro CDRL2 nebo L3 na obr. 3 (SEKV. ID. Č. 6) pro CDRL3.
3. Molekula protilátky podle nároku 1 nebo 2, která obsahuje těžký řetězec, ve kterém variabilní doména obsahuje CDR mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 1 pro CDRH1, SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 7 pro CDRH2 nebo SEKV. ID. Č. 3 pro CDRH3, a lehký řetězec, ve kterém variabilní doména obsahuje CDR mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 4 pro CDRL1, SEKV. ID. Č. 5 pro CDRL2 nebo SEKV. ID. Č. 6 pro CDRL3.
4. Molekula protilátky podle nároku 3, která obsahuje SEKV. ID. Č. 1 pro CDRH1, SEKV. ID. Č. 2 nebo SEKV. ID. Č. 7 pro CDRH2, SEKV. ID. Č. 3 pro CDRH3, SEKV. ID. Č. 4 pro CDRL1, SEKV. ID. Č. 5 pro CDRL2 a SEKV. ID. Č. 6 pro CDRL 3.
5. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, která obsahuje SEKV. ID. Č. 2 pro CDRH2.

6. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, která je CDR-roubovanou protilátkovou molekulou.
7. Molekula protilátky podle nároku 6, kde variabilní doména obsahuje humánní příjemcovské rámcové úseky a non-humánní dárčovské CDR.
8. Molekula protilátky podle nároku 7, kde humánní příjemcovské rámcové úseky variabilní domény těžkého řetězce jsou založeny na humánní kanonické sekvenci skupiny 1 a obsahují non-humánní dárčovské zbytky v polohách 28, 69 a 71.
9. Molekula protilátky podle nároku 7, kde humánní příjemcovské rámcové úseky variabilní domény těžkého řetězce jsou založeny na humánní kanonické sekvenci skupiny 1 a obsahují non-humánní dárčovské zbytky v polohách 28, 38, 46, 67, 69 a 71.
10. Molekula protilátky podle nároku 7, kde humánní příjemcovské rámcové úseky variabilní domény těžkého řetězce jsou založeny na humánní kanonické sekvenci skupiny 3 a obsahují non-humánní dárčovské zbytky v polohách 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 a 78.
11. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 7 až 10, kde humánní příjemcovské rámcové úseky variabilní domény lehkého řetězce jsou založeny na humánní kanonické sekvenci skupiny 1 a obsahují non-humánní dárčovské zbytky v polohách 46 a 60.
12. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, která obsahuje variabilní úsek lehkého řetězce hTNF40-gL1

(SEKV. ID. Č. 8) a variabilní úsek těžkého řetězce gh3hTNF40.4 (SEKV. ID. Č. 11).

13. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, která je fragment Fab.
14. Molekula protilátky podle nároku 12 a 13, která je fragment Fab obsahující těžký řetězec mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 111 a lehký řetězec mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113.
15. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, která je modifikovaný fragment Fab, mající na C-konci svého těžkého řetězce jednu nebo více aminokyselin, které dovolují navázání efektorové nebo reportérové molekuly.
16. Molekula protilátky podle nároku 15, kde dodatečné aminokyseliny vytvářejí modifikovanou kloubovou oblast obsahující jeden nebo dva cysteinové zbytky, ke kterým se může navázat efektorová nebo reportérová molekula.
17. Molekula protilátky podle nároku 12, která je modifikovaný fragment Fab obsahující těžký řetězec mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115 a lehký řetězec mající sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113.
18. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má lehký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113.
19. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113.

20. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115.
21. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115.
22. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má lehký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115.
23. Molekula protilátky specifická pro humánní TNF α , která má lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115.
24. Varianta molekuly protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 23, která má zlepšenou afinitu k TNF α .
25. Varianta podle nároku 24, která byla připravena postupem afinitního zrání.
26. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, která je myší anti-TNF α monoklonální protilátka hTNF40.
27. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, která je chimérická molekula protilátky obsahující variabilní domény lehkého a těžkého řetězce monoklonální protilátky podle nároku 26.

28. Sloučenina obsahující molekulu protilátky podle kteréhokoliv z nároků 15 až 23, která má na C-koncové aminokyselině nebo aminokyselině blízké C-konci těžkého řetězce kovalentně navázanou efektorovou nebo reportérovou molekulu.
29. Sloučenina podle nároku 28, která obsahuje efektorovou molekulu.
30. Sloučenina podle nároku 29, kde efektorová molekula obsahuje jeden nebo více polymerů.
31. Sloučenina podle nároku 30, kde jeden nebo více polymerů je volitelně substituováno přímým nebo rozvětveným řetězcem polyalkylenového, polyalkenylenového nebo polyoxyalkylenového polymeru nebo rozvětveným nebo nerozvětveným polysacharidem.
32. Sloučenina podle nároku 31, kde jeden nebo více polymerů je methoxypolyethylenglykol.
33. Sloučenina obsahující molekulu protilátky podle nároku 17 mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, přičemž každá aminoskupina lysylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).
34. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, a

mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázaný jeden nebo více syntetických nebo přirozeně se vyskytujících polymerů.

35. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, a mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázaný jeden nebo více syntetických nebo přirozeně se vyskytujících polymerů.
36. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, a mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lisylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).
37. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, a mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lisylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).

38. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lisylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).
39. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lisylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).
40. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, mající na jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lisylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).
41. Sloučenina obsahující molekulu protilátky specifické pro humánní TNF α , která má lehký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 113 a těžký řetězec tvořený sekvencí uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 115, mající na

jednom ze svých cysteinových zbytků na C-konci těžkého řetězce navázanou lysyl-maleimidovou skupinu, kde každá aminoskupina lysylového zbytku kovalentně váže methoxypolyethylenglykolový zbytek s molekulovou hmotností 20000 (Da).

42. Molekula protilátky obsahující hybridní CDR obsahující zkrácenou donorovou CDR sekvenci, kde chybějící část dárcovského CDR je nahrazena odlišnou sekvencí a tvoří funkční CDR.
43. Molekula protilátky podle nároku 42, kde chybějící část CDR sekvence je z protilátky, ze které jsou odvozeny rámcové úseky protilátkové molekuly.
44. Molekula protilátky podle nároku 43, kde chybějící část CDR sekvence je protilátky zárodečné linie mající kanonické rámcové úseky.
45. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 42 až 44, kde CDRH2 těžkého řetězce je hybrid v molekule protilátky.
46. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 42 až 45, kde donorový CDR je zkrácen o 1 až 8 aminokyselin.
47. Molekula protilátky podle nároku 46, kde zkrácení je o 4 až 6 aminokyselin.
48. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 42 až 47, kde zkrácení je provedeno na C-konci CDR.
49. Sekvence DNA kódující těžký a/nebo lehký řetězec molekuly protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48.

50. Sekvence DNA podle nároku 49 obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 8 nebo 10.
51. Sekvence DNA podle nároku 49 obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 10 nebo 11.
52. Sekvence DNA podle nároku 49 obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKV. ID. Č. 110, 112 nebo 114.
53. Klonovací nebo expresní vektor obsahující sekvenci DNA podle kteréhokoliv z nároků 49 až 52.
54. Expresní vektor pro *E. coli* obsahující sekvenci DNA podle kteréhokoliv z nároků 49 až 52.
55. Expresní vektor pro *E. coli*, který je pTTO(CDP870).
56. Hostitelská buňka transformovaná vektorem podle kteréhokoliv z nároků 53 až 55.
57. Způsob přípravy molekuly protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se kultivuje hostitelská buňka podle nároku 56 a izoluje se molekula protilátky.
58. Způsob přípravy molekuly protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se kultivuje *E. coli* obsahující expresní vektor pro *E. coli* obsahující sekvenci DNA podle kteréhokoliv z nároků 53 až 55 a izoluje se molekula protilátky.

59. Způsob podle nároku 58 v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekula protilátky je nasměrována do periplazmy.
60. Tarapeutický nebo diagnostický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje molekulu protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48 nebo sloučeninu podle kteréhokoliv z nároků 28 až 41.
61. Molekula protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48 specifická pro humánní TNF α nebo sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 28 až 41 pro použití k léčení nemocí zprostředkovaných TNF α .
62. Molekula protilátky nebo sloučenina podle nároku 61 pro použití k léčení revmatoidní artritidy nebo osteoartritidy.
63. Použití molekuly protilátky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27 a 42 až 48 specifické pro humánní TNF α nebo sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 28 až 41 pro výrobu léku k léčení nemocí zprostředkovaných TNF α .
64. Použití podle nároku 63, kde nemoc je revmatoidní artritida nebo osteoartritida.
65. Vektor pDNABEng-G1 jak je uveden na obr. 19.
66. Vektor pTTO(CDP870) jak je uveden na obr. 22.
67. Polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako kterákoliv ze sekvencí SEKV. ID. Č. 1 až SEKV. ID. Č. 7.

08.03.02

1/27

PV002-837

18019

Obr. 1

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

Kánon hum. skupiny 1	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEKV. ID. Č. 83)
hTNF40	:	DI <u>V</u> MTQSO <u>KFMST</u> SVGDRV <u>SV</u> TC (SEKV. ID. Č. 84)
Kánon hum. skupiny 1	:	WYQQKPGKAPKLLIY (SEKV. ID. Č. 85)
hTNF40	:	WYQQKPGOSP <u>KAL</u> IY (SEKV. ID. Č. 86)
Kánon hum. skupiny 1	:	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEKV. ID. Č. 87)
hTNF40	:	GV <u>PY</u> R <u>F</u> TGSGSGTDFTLTISTV <u>Q</u> SEDL <u>A</u> EY <u>F</u> C (SEKV. ID. Č. 88)
Kánon hum. skupiny 1	:	FGQGTKVEIKR (SEKV. ID. Č. 89)
hTNF40	:	FGAGTKLE <u>L</u> KR (SEKV. ID. Č. 90)

Obr. 3

Sekvence úseků CDR z hTNF40

- H1 DYGMN (SEKV. ID. Č. 1)
- H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (SEKV. ID. Č. 7)
- H2' WINTYIGEPIYADSVKG (SEKV. ID. Č. 2)
- H3 GYRSYAMDY (SEKV. ID. Č. 3)
- L1 KASQNVGTNVA (SEKV. ID. Č. 4)
- L2 SASFLYS (SEKV. ID. Č. 5)
- L3 QQYNIYPLT (SEKV. ID. Č. 6)

Obr. 2

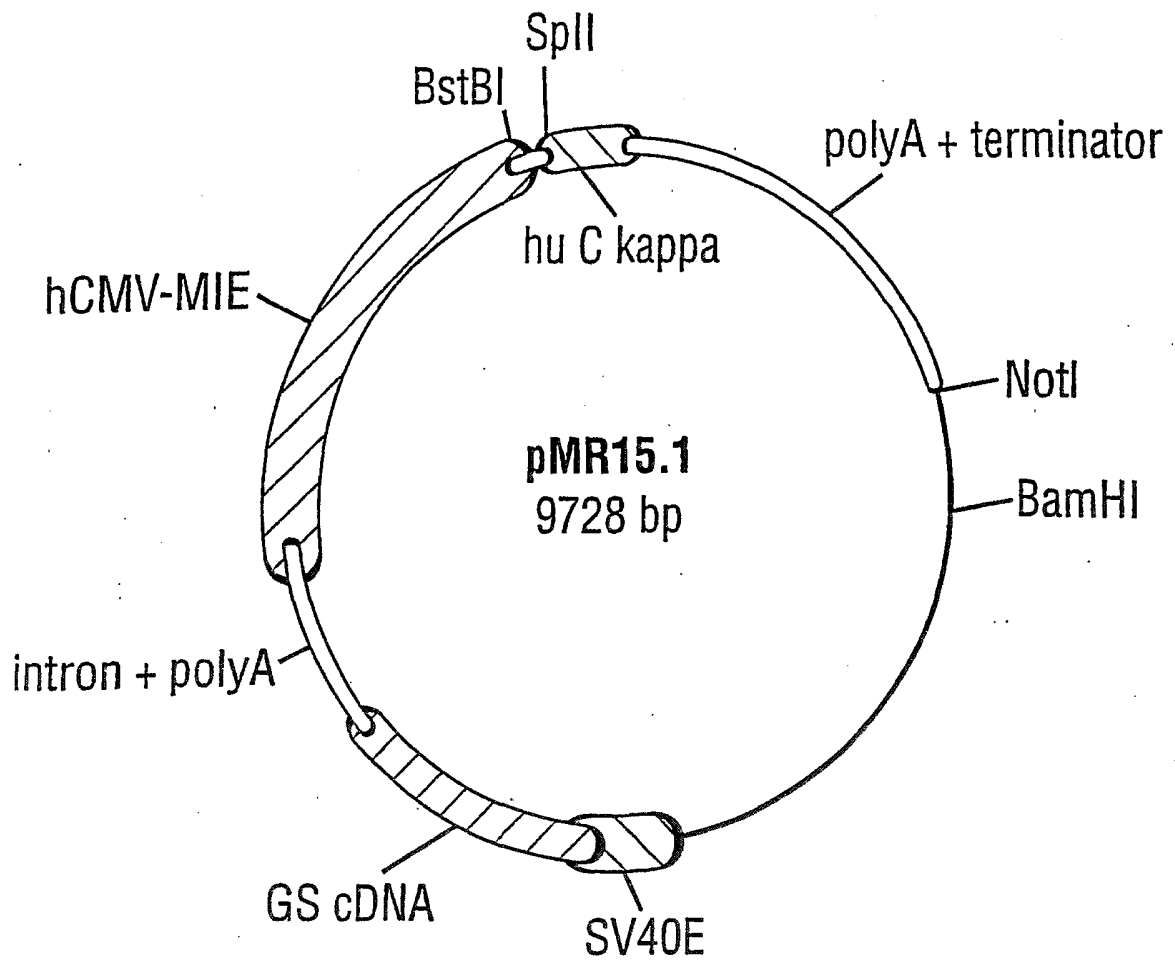
Srovnání rámcových úseků těžkého řetězce protilátky hTNF40
a kanonických sekvencí humánních skupin 1 a 3

Kánon hum. skupiny 1	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEKV. ID. Č. 91)
hTNF40	: <u>Q</u> IQLVQSG <u>P</u> ELKK <u>P</u> ETVKI <u>S</u> CKASGY <u>V</u> FT (SEKV. ID. Č. 92)
Kánon hum. skupiny 1	: WVRQAPGQGLEWMG (SEKV. ID. Č. 93)
hTNF40	: WVKQAPGKAFKWMG (SEKV. ID. Č. 94)
Kánon hum. skupiny 1	: RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEKV. ID. Č. 95)
hTNF40	: <u>R</u> FAFSLETS <u>A</u> STAF <u>L</u> QINN <u>L</u> KNEDTATY <u>F</u> CAR (SEKV. ID. Č. 96)
Kánon hum. skupiny 1	: WGQGTLLTVSS (SEKV. ID. Č. 97)
hTNF40	: WGQGT <u>L</u> TVSS (SEKV. ID. Č. 98)
Kánon hum. skupiny 3	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEKV. ID. Č. 106)
hTNF40	: <u>Q</u> IQLVQSG <u>P</u> ELKK <u>P</u> ETVKI <u>S</u> CKASGY <u>V</u> FT (SEKV. ID. Č. 92)
Kánon hum. skupiny 3	: WVRQAPGKGLEWVS (SEKV. ID. Č. 107)
hTNF40	: WVKQAPGKAFKWMG (SEKV. ID. Č. 94)
Kánon hum. skupiny 3	: RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (SEKV. ID. Č. 108)
hTNF40	: <u>R</u> FAFSLETS <u>A</u> STAF <u>L</u> QINN <u>L</u> KNEDTATY <u>F</u> CAR (SEKV. ID. Č. 96)
Kánon hum. skupiny 3	: WGQGTLLTVSS (SEKV. ID. Č. 109)
hTNF40	: WGQGT <u>L</u> TVSS (SEKV. ID. Č. 98)

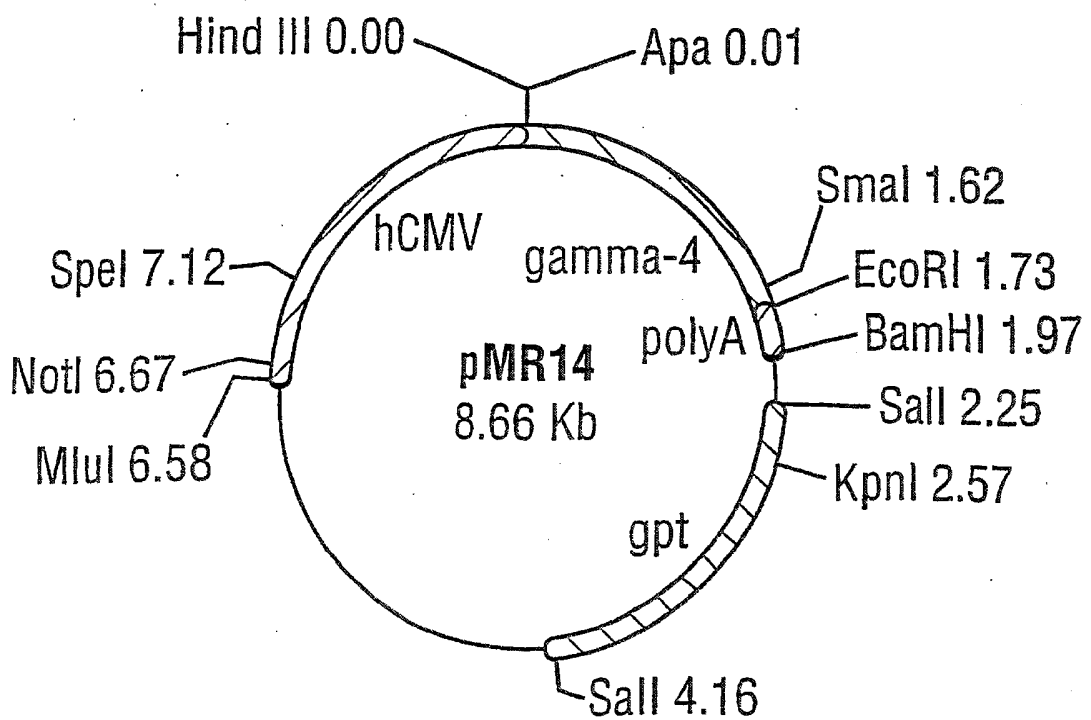
08.03.02

3/27

Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Myší VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 99)

```

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

60      70      80      90      100
GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT
CAG TCG CAG TGG ACG TTC CGG TCA GTC TTA CAC CCA TGA TTA CAT 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 GGT 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 TAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT 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 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 TAT CAC TCG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CTC GAC TTT GCA
ATA TTG TAG ATA GGA GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTT GAC CTC GAC TTT GCA
Y   N   I   I   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>

```

Obr. 7

Myší Vh sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 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  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 AAC AAC GTC TAG TTG TTG GAG TTT TTA CTC CTG
E  T  S  A  S  T  A  F  L  Q  I  N  N  L  K  N  E  D>

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

```

5/27

09.03.09

Obr. 8

Roubovaná VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 8)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG 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 TTT CGG 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 TCA 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 GGT CTT CTA AAG CGG TGA ATA ATG ACA GTT GTC
L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q>

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

```

6/27

00000000

Roubovaná VI sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 9)

10	20	30	40	50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG	CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC	D I Q M T Q 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 AAC GTA GCC TGG TAT	CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TCG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA	V T I T C K A S Q Q N V G T N V A W Y>		
110	120	130	140	150
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 K P G G K A P K L 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 S G S G S G T D F T>		
220	230	240	250	260
CTC ACG ATC AGT AGC CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG	GAG TGC TAG TCA TCG GAG GTC GGT CTT CTA AAG CCG TGA ATA ATG ACA GTT GTC	L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q>		
280	290	300	310	320
TAT AAC ATC TAC CCA CTC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA GAA ATC AAA	ATA TTG TAG ATG GGT GAG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT CTT TAG TTT	Y N I Y P L T T F G Q Q G T K V E I K>		

Obr. 10

Roubovaná Vh sekvence hTNF40 (SEKV. ID. Č. 10)

```

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

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

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

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

220 230 240 250 260 270
    GAC ACC TCC ACA AGC ACT GCA TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC
    CTG TGG AGG TGT TCG TGA CGT ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG
    D T S 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 GTC ACA GTC TCC TCA
    CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT
    G Q G T L V T V S S>

```

Obr. 11

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

```

10      20      30      40      50
GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCA GGA GGC GGT CTC GTG CAG CCT GGC GGA TCA CTG
CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGT CCT CCG CCA GAG CAC GTC GGA CCG CCT AGT GAC
E V Q L V E S G G 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 G K G L E W M G W I N T Y>

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

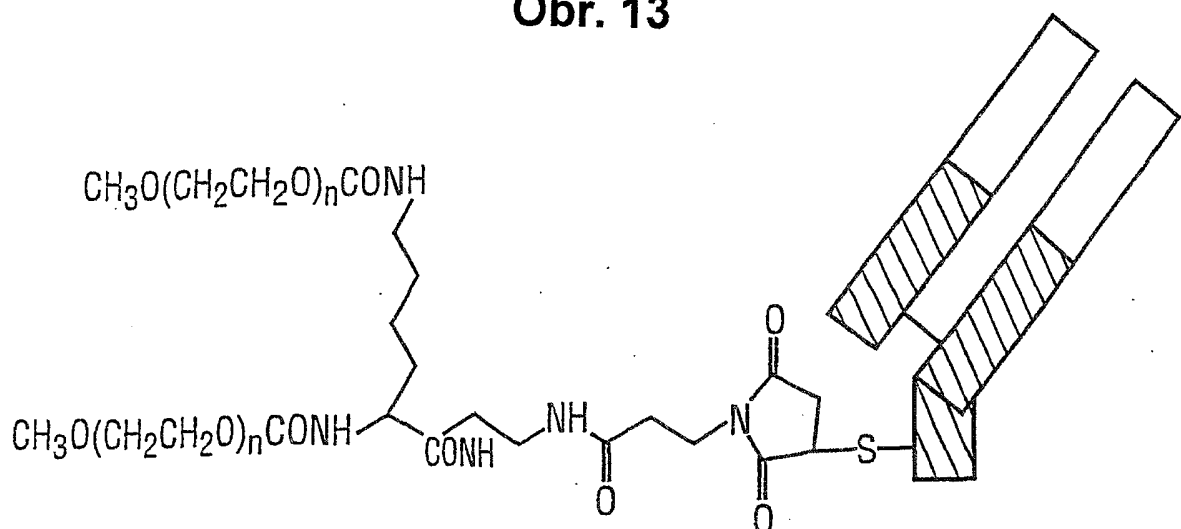
280     290     300     310     320
ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CGG TAC CTG ATG ACC
T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>

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>

```

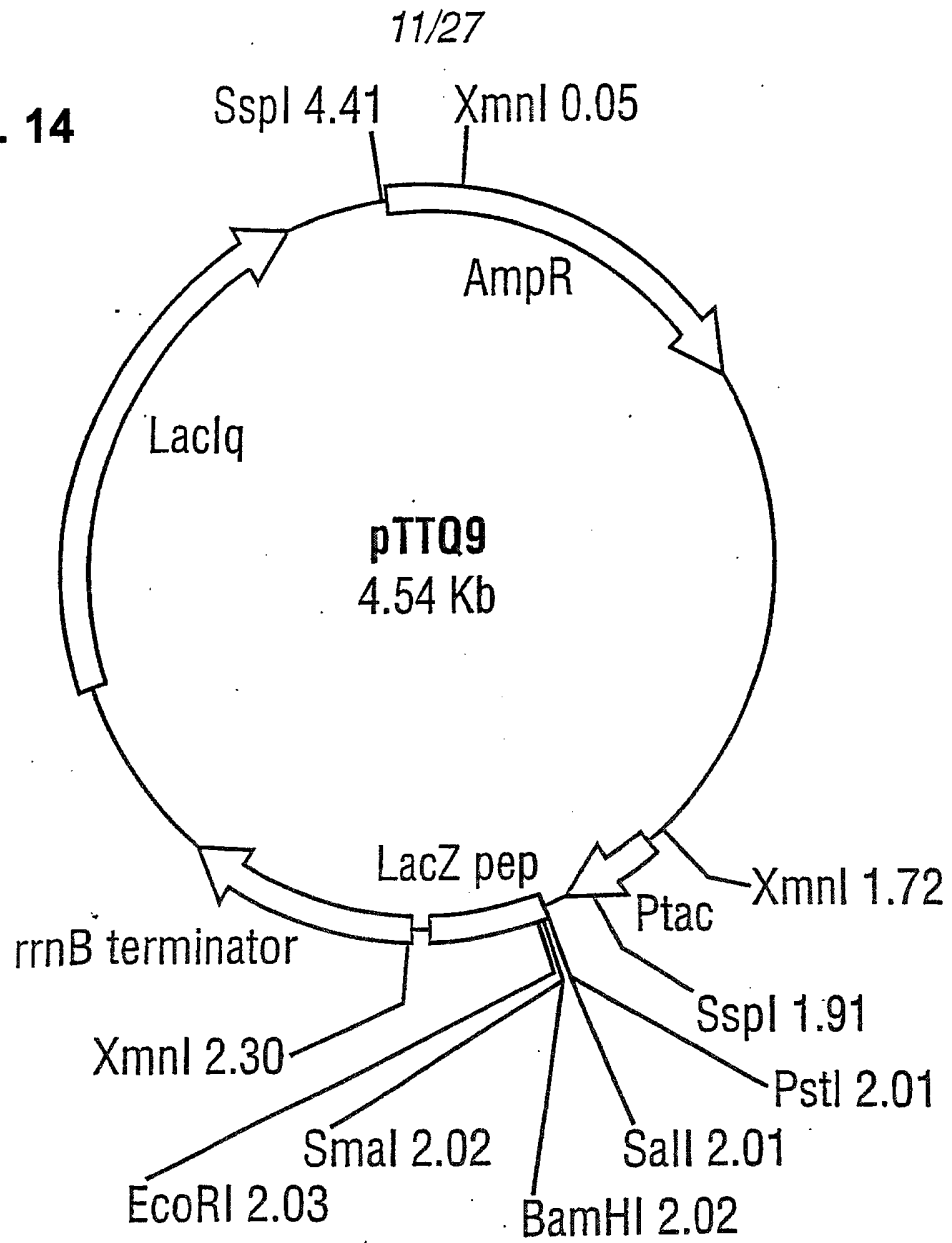
9/27

08.09.00

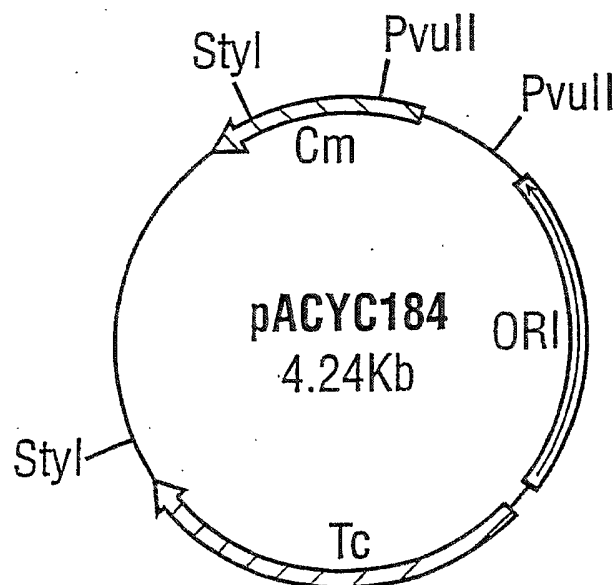


08.03.02

Obr. 14



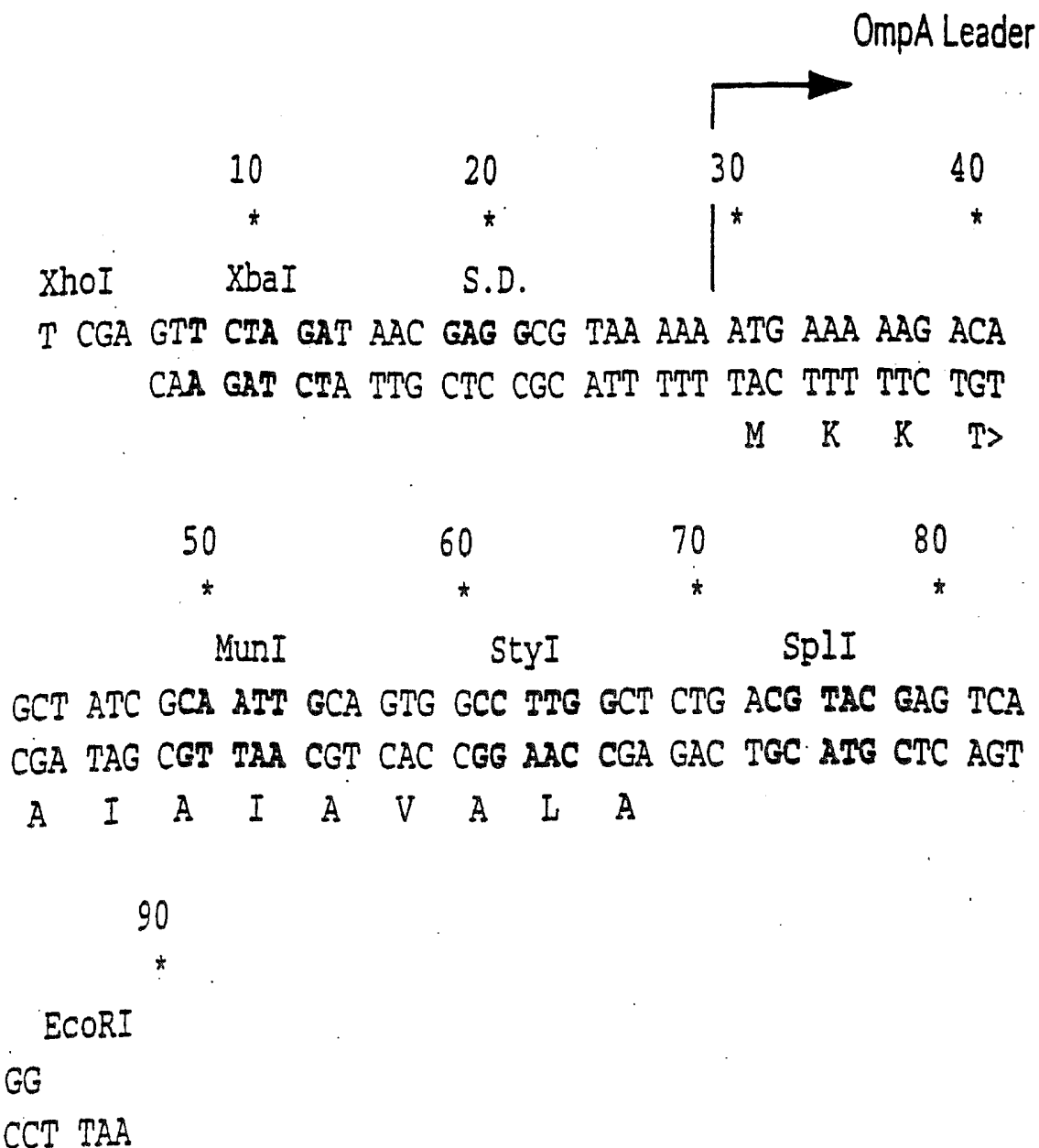
Obr. 16



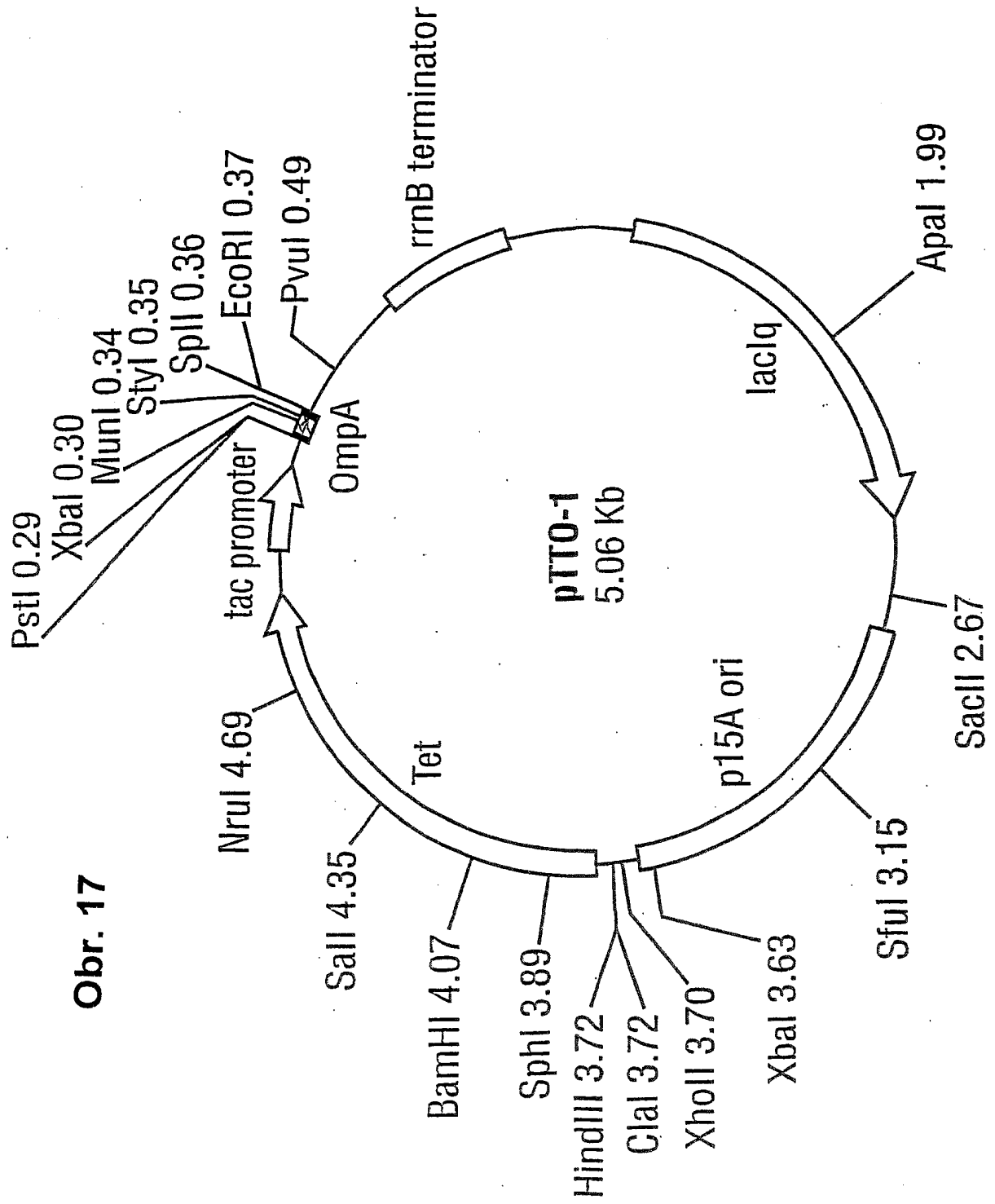
12/27

Obr. 15

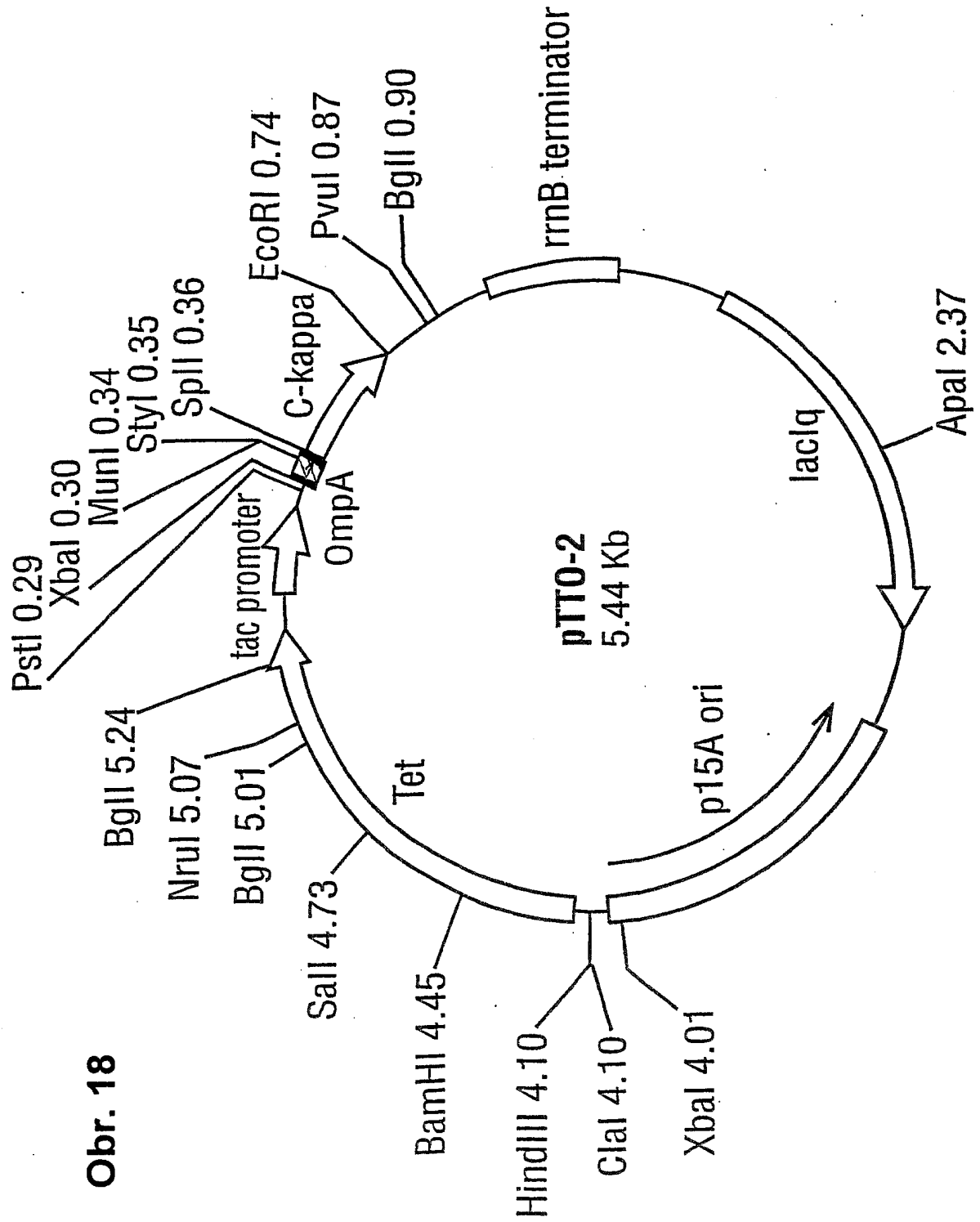
Sekvence oligonukleotidového adaptoru OmpA (SEKV. ID. Č.101)



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

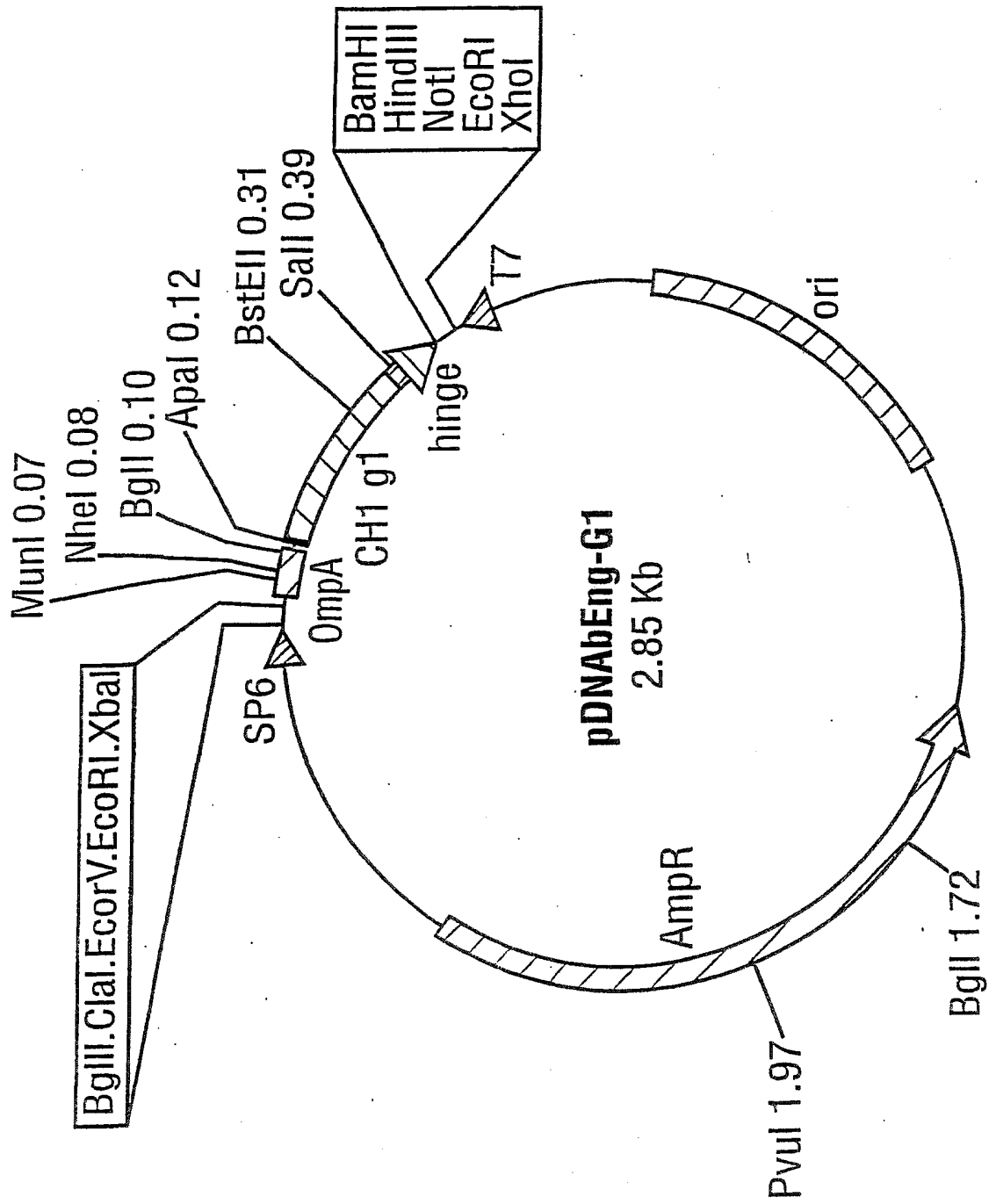


14/27



15/27

Obr. 19



Obr. 20

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

IGS kazeta-1

Intergenic space = -1

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

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

Konec sekvence c-Kappa →

Začátek sekvence OmpA →

IGS kazeta-2

mezigenový prostor = +1

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

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

IGS kazeta-3

mezigenový prostor = +13

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

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

IGS kazeta-4

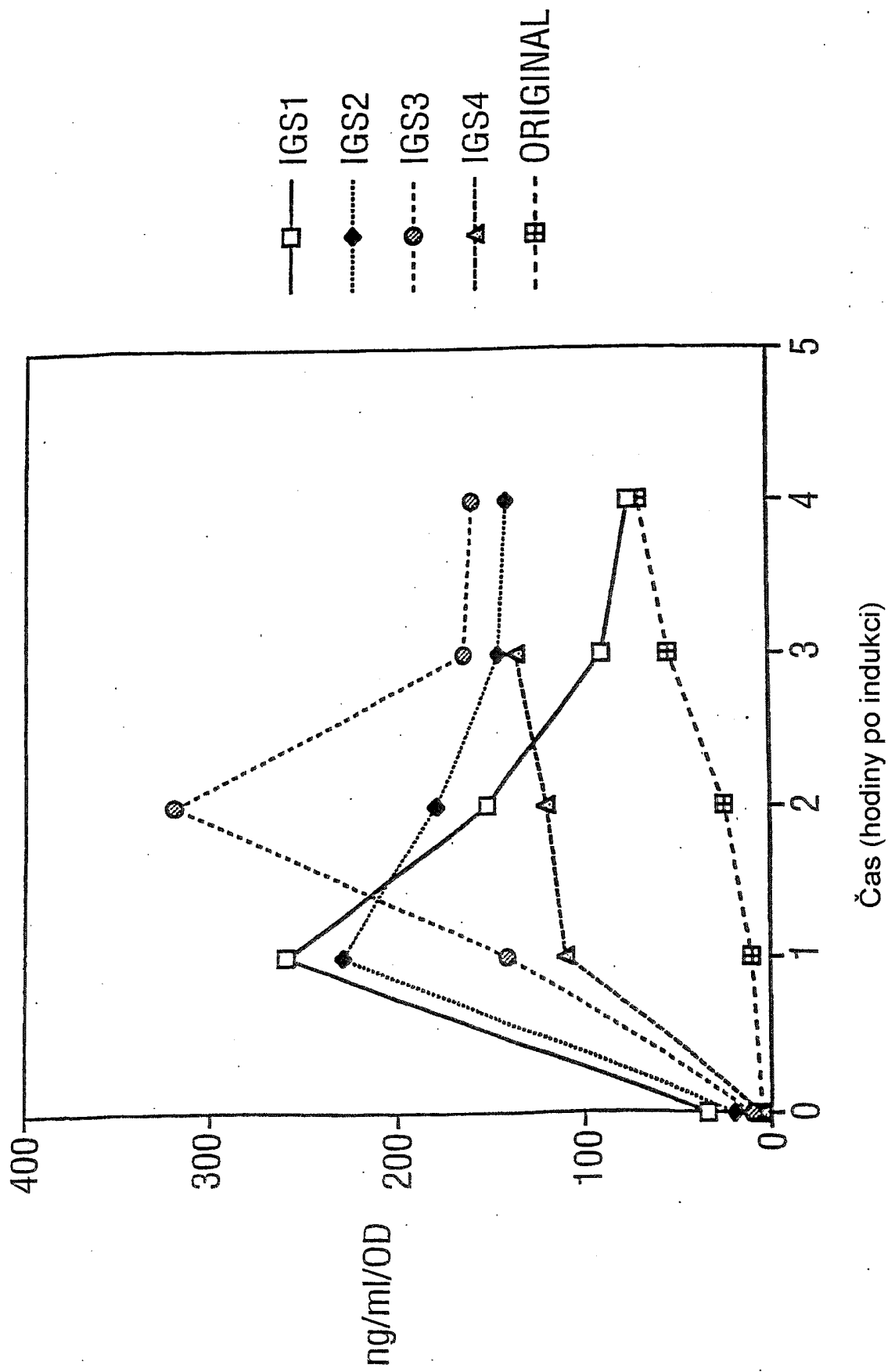
mezigenový prostor = +13

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

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

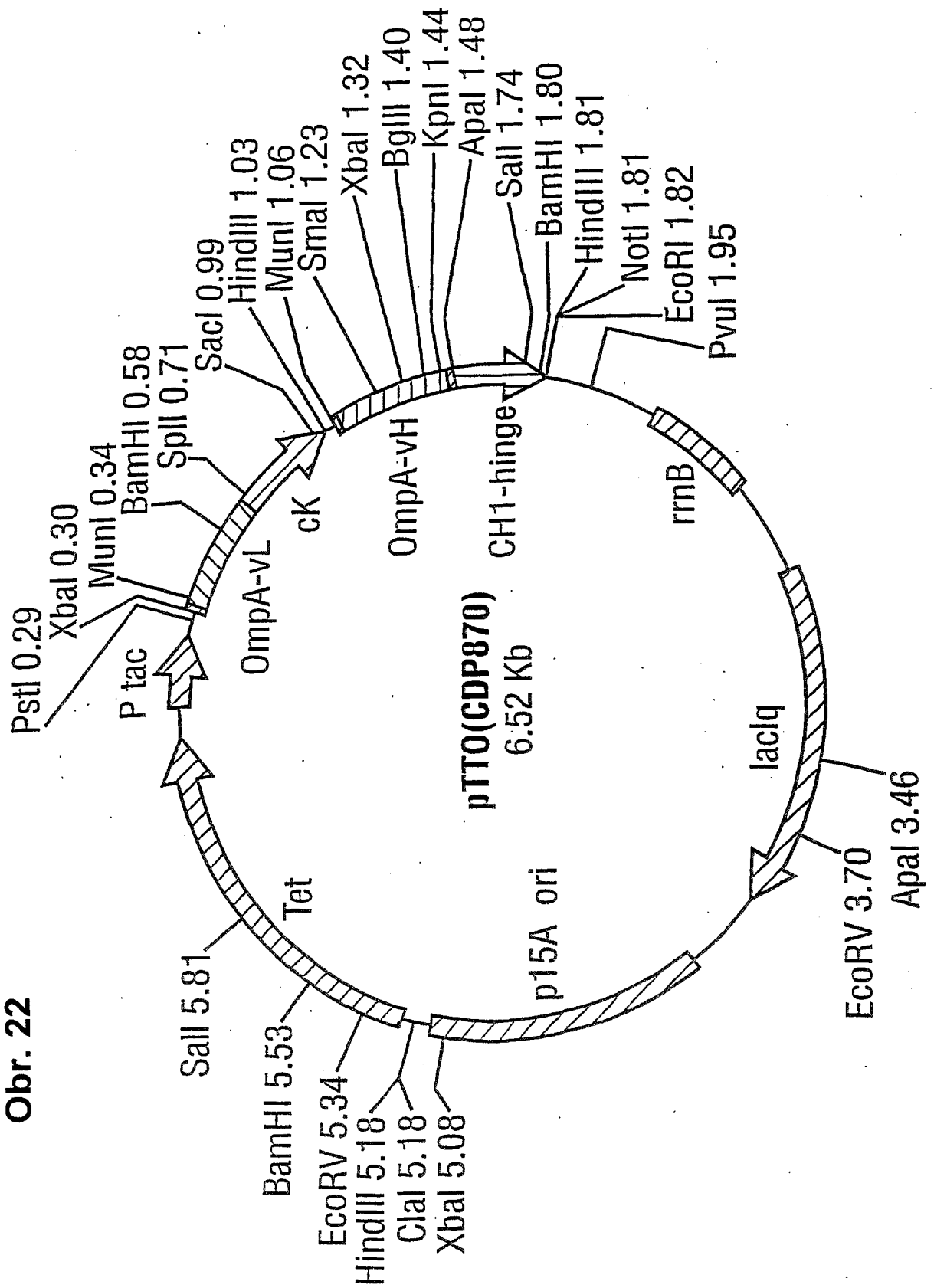
Obr. 21

Akumulace Fab' v periplazmě – IGS varianty



18/27

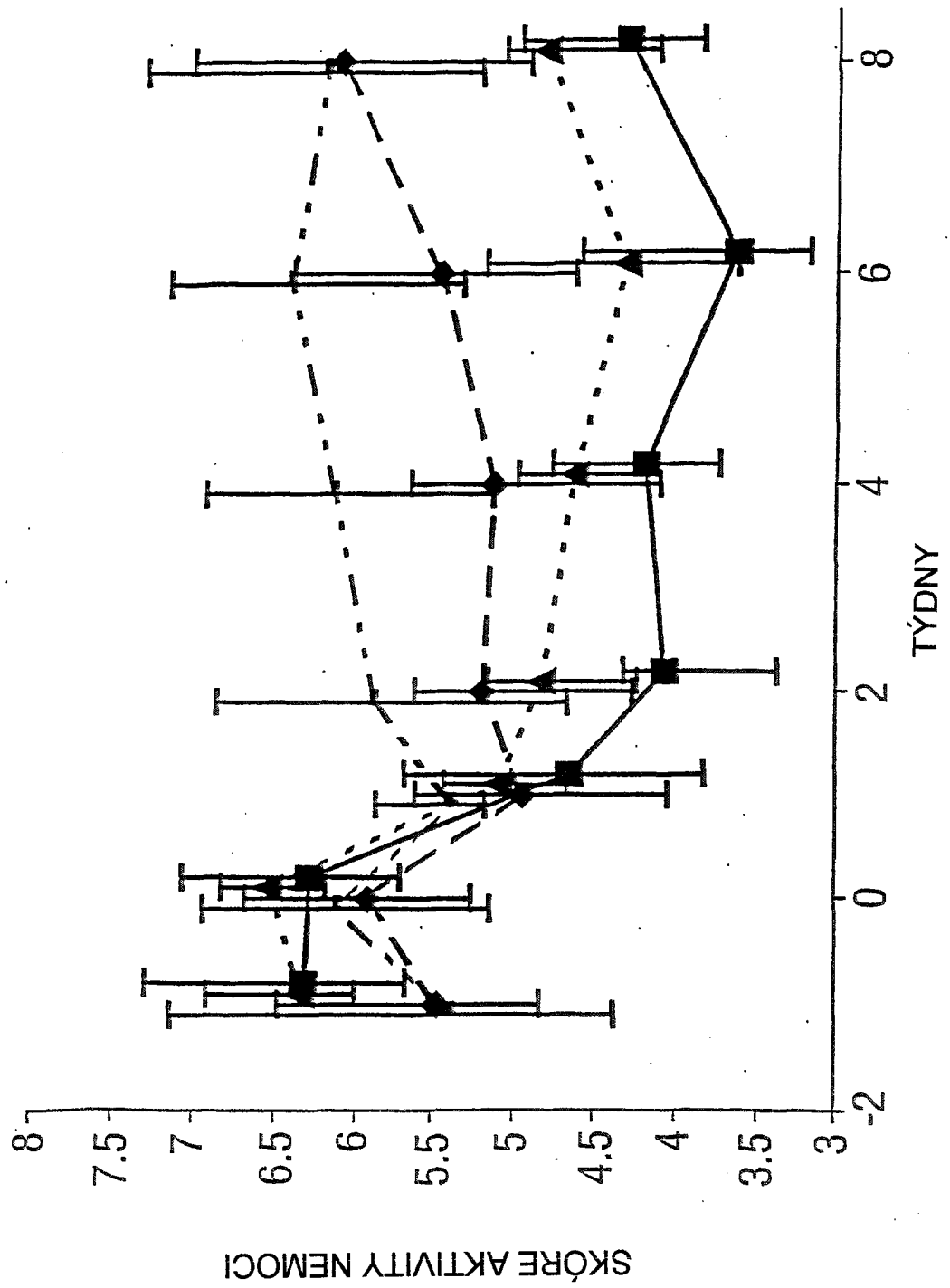
Obr. 22



08.03.02

19/27

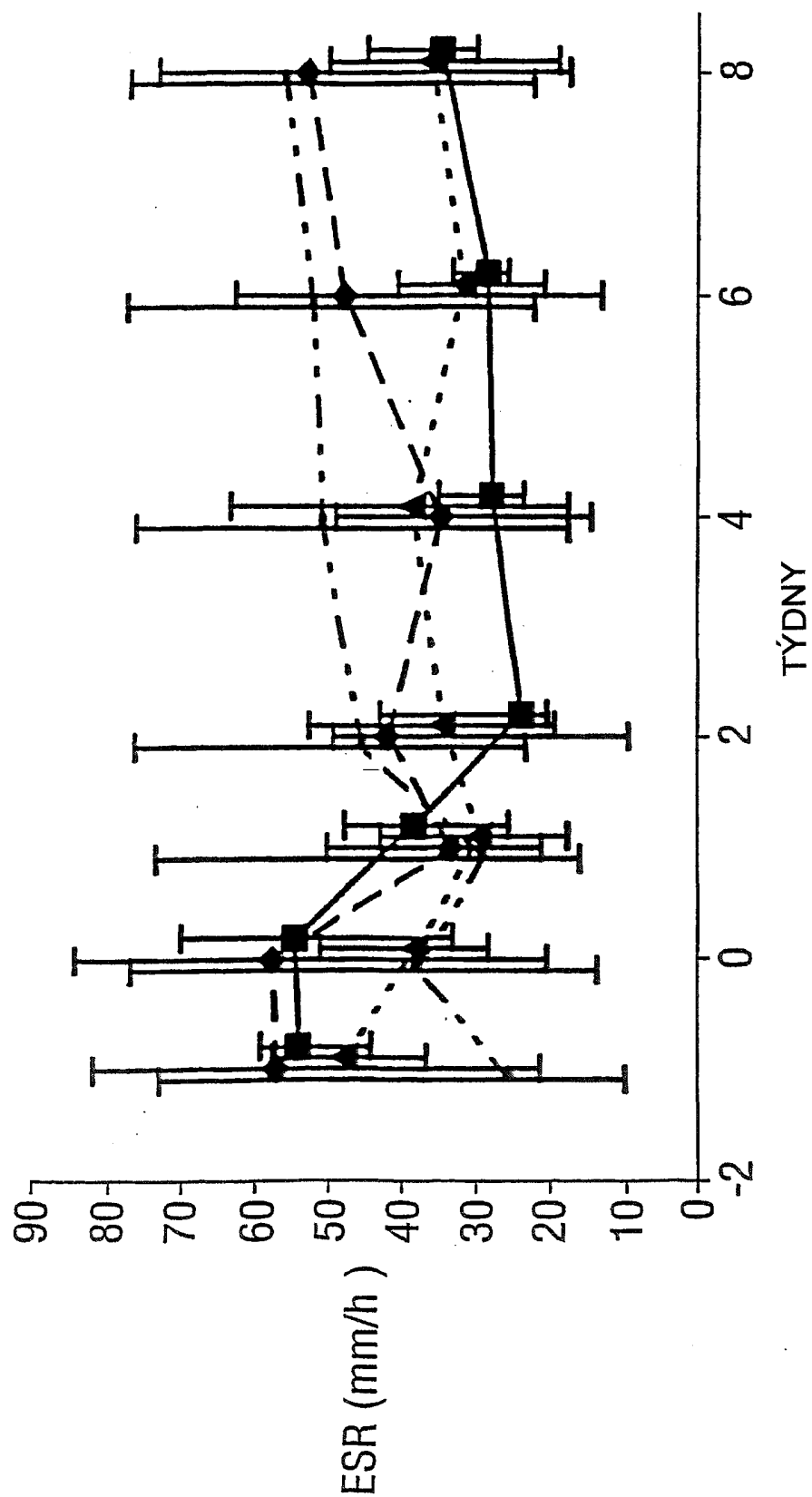
Obr. 23



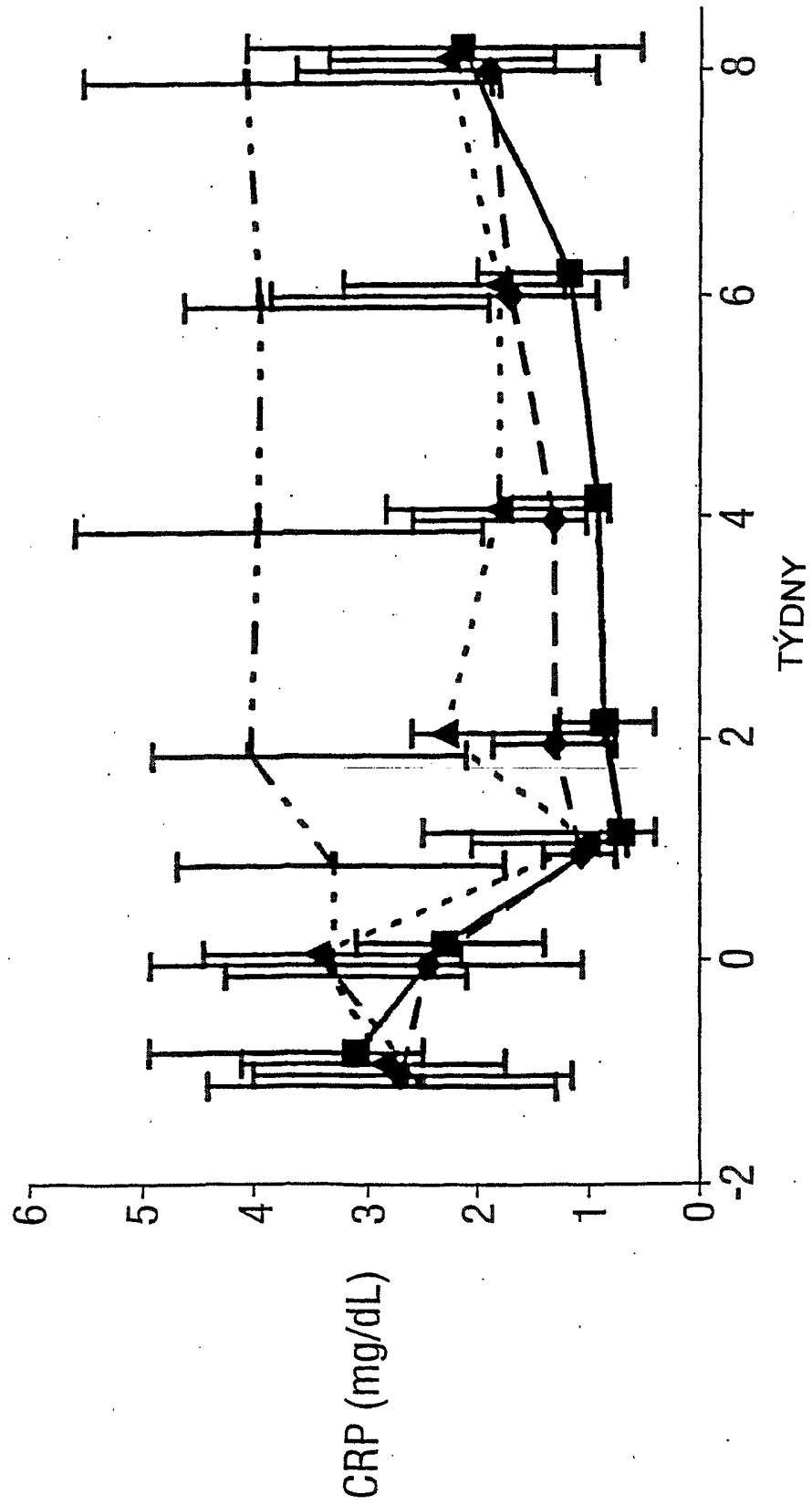
08.03.02

20/27

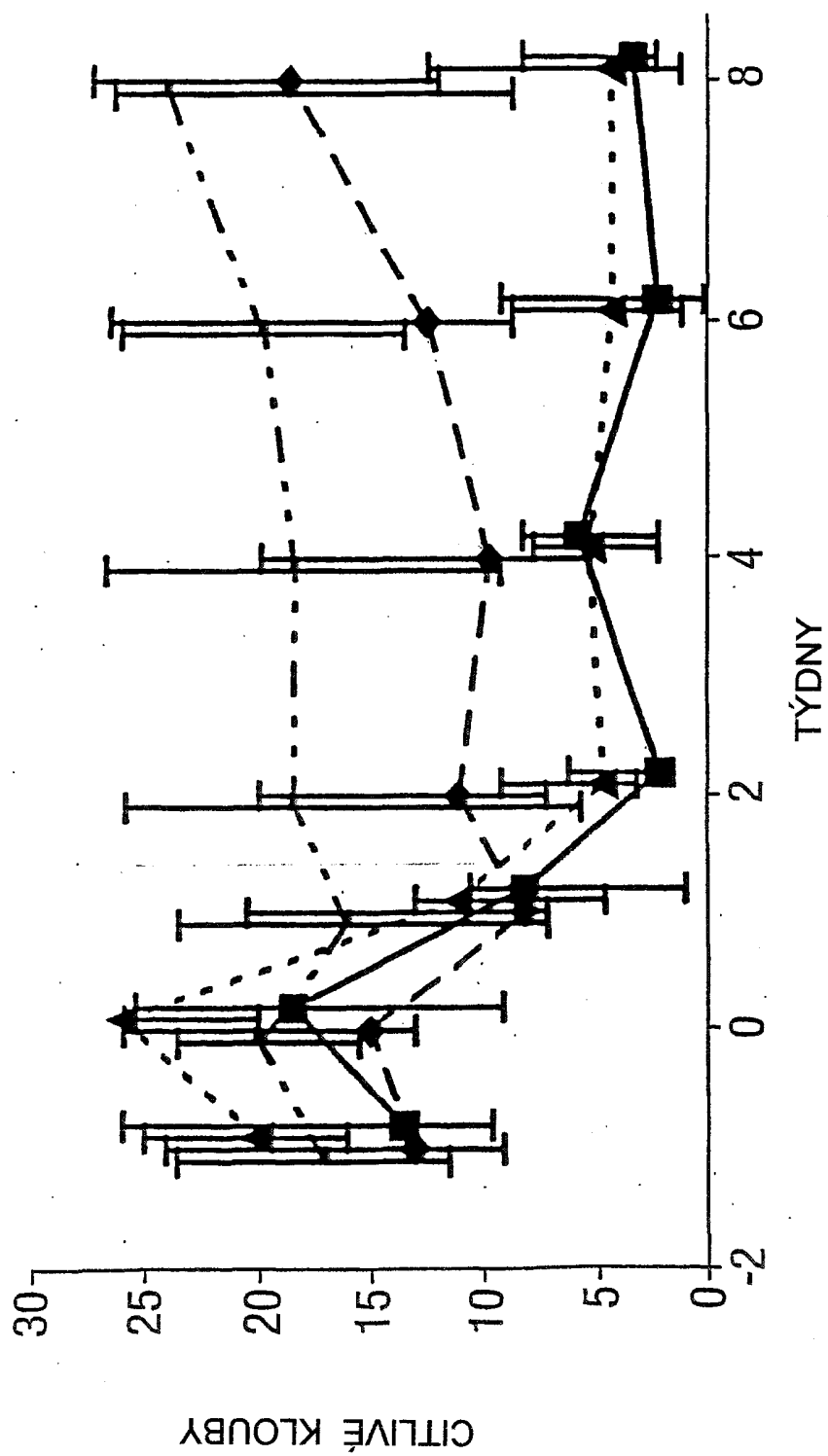
Obr. 24



Obr. 24 (pokrač.)



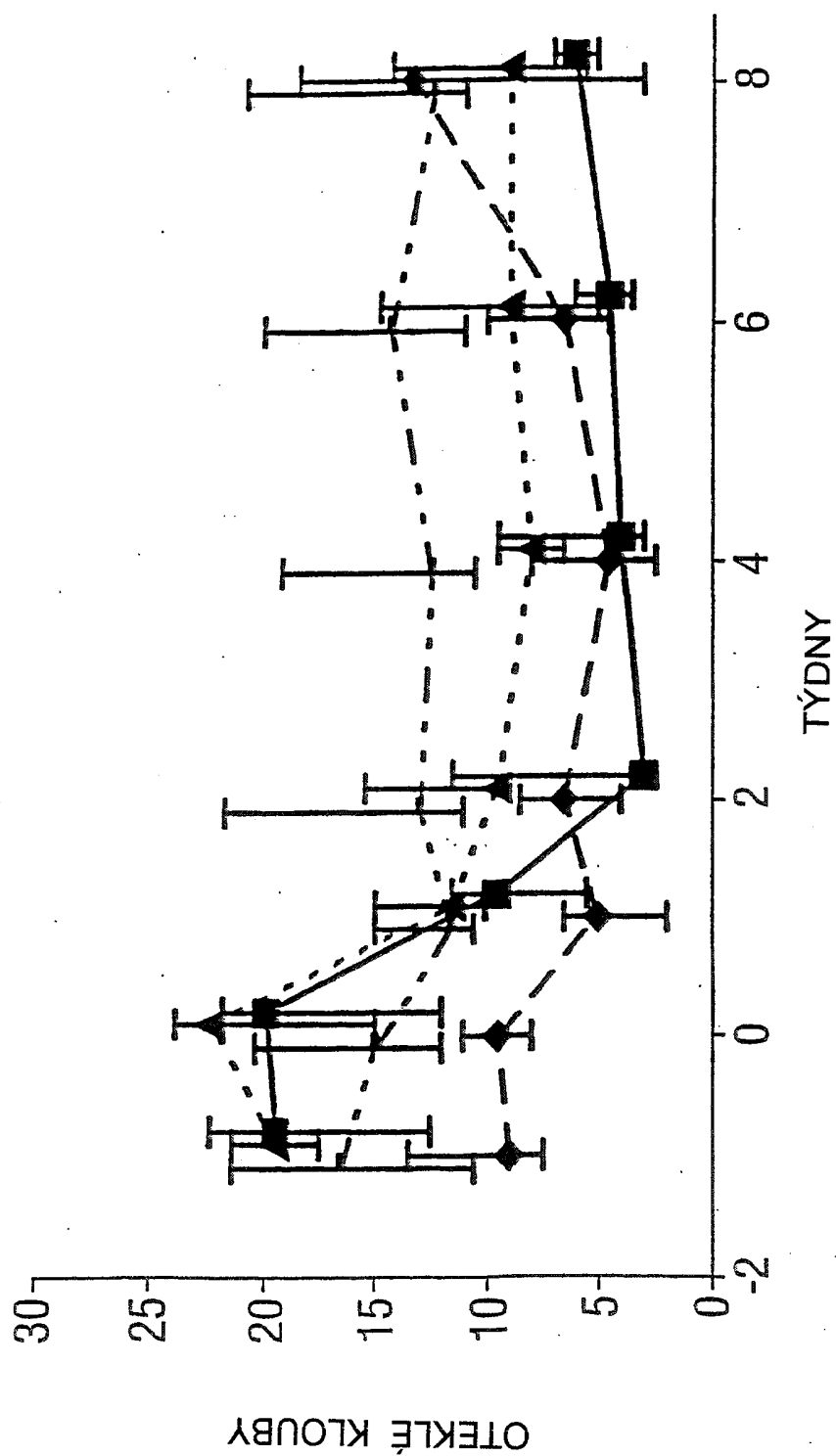
Obr. 24 (pokrač.)



05.03.02

23/27

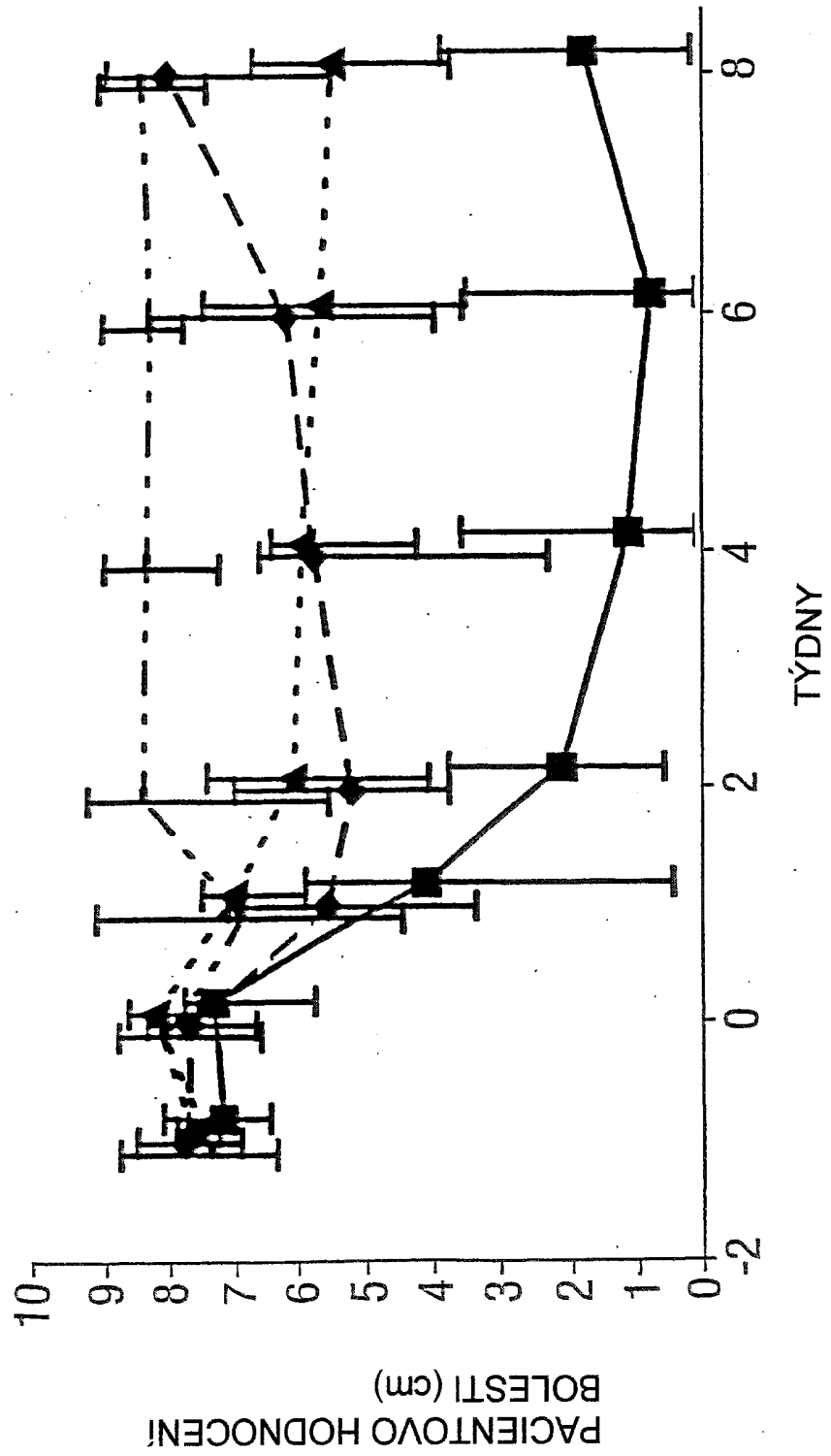
Obr. 24 (pokrač.)



08.03.02

24/27

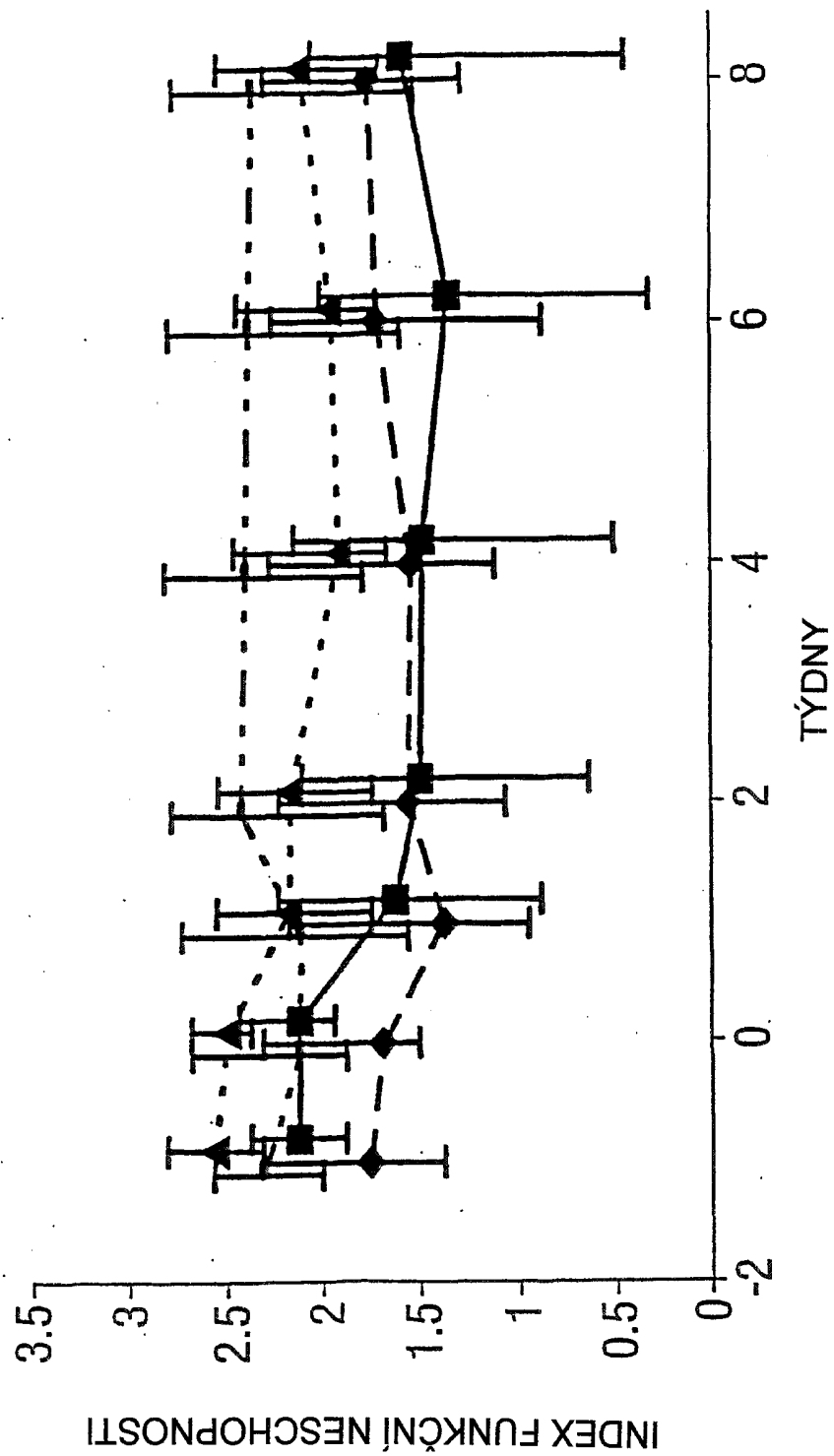
Obr. 24 (pokrač.)



08.03.02

25/27

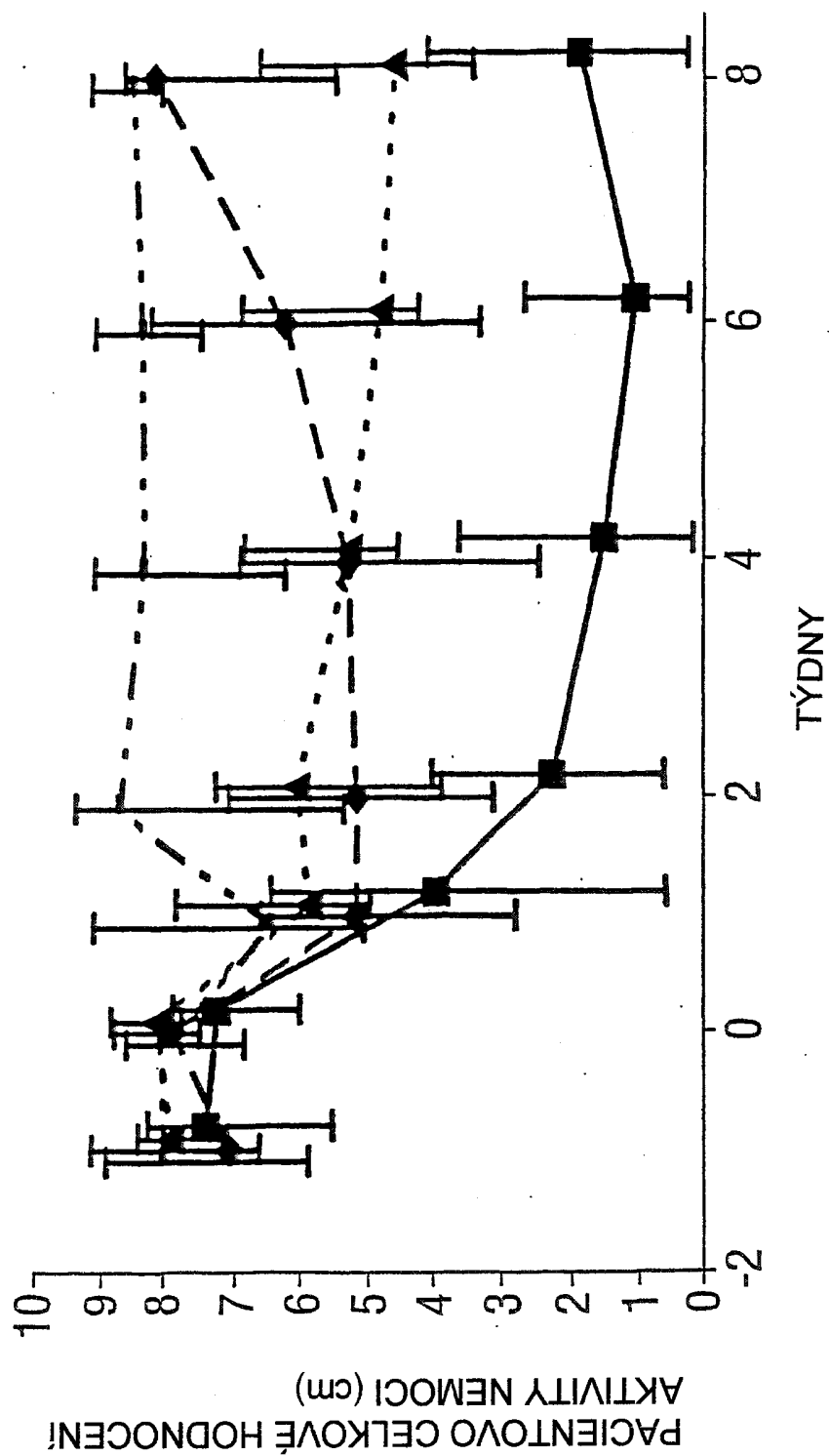
Obr. 24 (pokrač.)



08.03.02

26/27

Obr. 24 (pokrač.)



27/27

Obr. 24 (pokrač.)

