CAVELIER ABOGADOS. Colo: 13115-841-001-2

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

02 8005 0

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02008005 00000000
Fecha (AMD): 2002-02-01 16:54:57 Folios: 283 ón
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 **SOLICITUD DE:**

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 **SOLICITANTE (71)**

Nombre: CELLTECH R&D LIMITED sociedad constituida y existente bajo las leyes del Reino Unido.
Dirección: 208 . Bath Road, Slough, Berkshire, SL1 3 WE, Reino Unido.

Nacionalidad: Británica.

Teléfono: 546 09 70
Fax:: 249 40 70
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Berkshire, Reino Unido.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____

Número: _____

3 **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax:: 217 92 11
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____

Número: _____ T.P. _____

4 **INVENTOR (ES) (72)**

1. Diljeet Singh ATHWAL
208 Bath Road, Slough, Berkshire, SL1 3 WE, Reino Unido.
2- Derek Thomas BROWN
208 Bath Road, Slough Berkshire, SL1 3WE, Reino Unido.
3- Andrew Neil Charles WEIR
208 Bath Road, Slough, Berkshire, SL1 3 WE, Reino Unido.
4- Andrew George POPPLEWELL
208 Bath Road, Slough, Berkshire, SL1 3 WE, Reino, Unido.
5- Andrew Paul CHAPMAN
208 Bath Road, Slough, Berkshire, SL1 3 WE, Reino Unido
6- David John KING
744 Terrace Drive, Belmont, CA 94002, Estados Unidos de América.

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No- PCT/GB01/02477 Fecha 5 de Junio de 2001
Publicación Internacional No. WO 01/94585 A1 Fecha: 13 de diciembre de 2001

6 **Título (54)** MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA HUMANO, Y USO DE LAS MISMAS.

7 **Clasificación Internacional (51)** C 12 N 015/013

8 **Prioridad** SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	GB.	6 de junio de 2000	0013810.7

9 **Comprobante de pago No.** 02-4.979 **por** $ 378.000.oo **Fecha:** 21 de enero de 2002

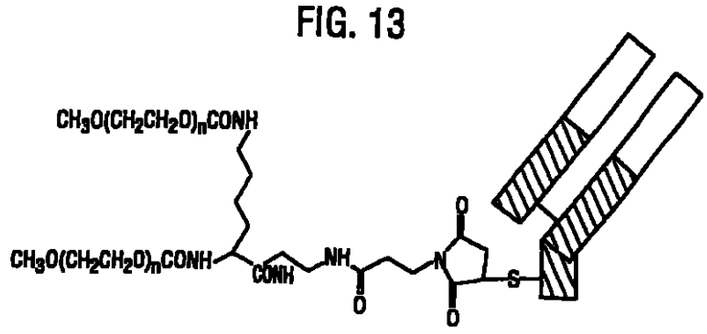
10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) (27 págs. dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ OTROS

3 25

11 **FIGURA CARACTERISTICA:**

FIG. 13



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JJC/mrm-Id-2.

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA HUMANO, Y USO DE LAS MISMAS

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral alfa humano (TNFα). La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a procedimientos para producir la molécula de anticuerpo.

Esta invención se refiere a moléculas de anticuerpo. En una molécula de anticuerpo, hay dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tiene en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto de cuatro regiones estructurales (FR) que se alternan con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los restos de los dominios variables convencionalmente se numeran de acuerdo con un sistema ideado por Kabat y col. Este sistema se explica en Kabat y col., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Departament of Health and Human Services, NIH, USA (en lo sucesivo "Kabat y col. (supra)"). En la presente memoria descriptiva se usa este sistema de numeración, excepto cuando se indique otra cosa.

Las denominaciones de Kabat de los restos no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los

restos de aminoácidos. La secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat, que corresponden a un acortamiento o a una inserción dentro de un componente estructural, ya sea una porción estructural o una CDR, de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los restos para un anticuerpo dado puede determinarse por alineación de restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los restos 31-35 (CDRH1), en los restos 50-65 (CDRH2) y en los restos 95-102 (CDRH3) de acuerdo con la numeración de Kabat.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los restos 24-34 (CDRL1), en los restos 50-56 (CDRL2) y en los restos 89-97 (CDRL3) de acuerdo con la numeración de Kabat.

En la Solicitud de Patente Europea EP-A-0239400, que describe un procedimiento en el que las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en las regiones estructurales de los dominios variables de una inmunoglobulina humana por mutagénesis de localización dirigida usando oligonucleótidos largos, se describe la construcción de anticuerpos con CDR injertadas. Las CDR determinan la especificidad de unión de

antígenos de los anticuerpos y son secuencias peptídicas relativamente cortas llevadas en las regiones estructurales de los dominios variables.

Los trabajos previos sobre la humanización de anticuerpos monoclonales por injerto de CDR se realizaron sobre anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, Verhoeyen y col. (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann y col. (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente, han descrito ejemplos en los que un anticuerpo monoclonal de ratón que reconocía una lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata que reconocía un antígeno presente sobre las células T humanas se humanizaron por injerto de CDR.

Riechmann y col., descubrieron que la transferencia de las CDR solas (como se definen por Kabat (Kabat y col. (*supra*) y Wu y col., J. Exp. Med. 132, 211-250, 1970) no era suficiente para proporcionar una actividad de unión a antígenos satisfactoria en el producto en el que se habían injertado las CDR. Se descubrió que tenían que alterarse varios restos estructurales de manera que correspondieran a los de la región estructural donadora. Los criterios propuestos para la selección de los restos estructurales que necesitan alterarse se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 90/07861.

Se han publicado varias revisiones que describen

anticuerpos con CDR injertadas, incluyendo Vaughan y col. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

El TNFα es una citocina pro-inflamatoria que se libera e interacciona con las células del sistema inmune. De esta forma, el TNFα se libera por macrófagos que se han activado por lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas. Como tal, el TNFα parece ser un mediador endógeno de importancia central implicado en el desarrollo y en la patogénesis del choque endotóxico asociado con las sepsis bacterianas. También se ha demostrado que el TNFα está regulado positivamente en varias enfermedades humanas, incluyendo enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la esclerosis múltiple. Los ratones transgénicos para el TNFα humano producen altos niveles de TNFα constitutivamente y desarrollan una poliartritis espontánea destructiva que se parece a la artritis reumatoide (Kaffer y col., EMBO J., 10 4025-4031, 1991). Por lo tanto, el TNFα se denomina citocina pro-inflamatoria.

En la técnica anterior se han descrito anticuerpos monoclonales contra el TNFα. Meager y col., (Hybridoma, 6 305-311, 1987) describen anticuerpos monoclonales murinos contra el TNFα recombinante. Fendly y col., (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) describen el uso de anticuerpos monoclonales murinos contra el TNFα recombinante en la definición de

epítopos neutralizadores sobre TNF. Shimamoto y col., (Immunology Letters, 17, 311-318, 1998) describen el uso de anticuerpos monoclonales murinos contra el TNFγ y su uso en la prevención del choque endotóxico en ratones. Además, en la Solicitud de Patente Internacional WO 92/11383 se describen anticuerpos recombinantes, incluyendo anticuerpos con CDR injertadas, específicos para el TNFα. Rankin y col., (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) describen el uso de tales anticuerpos con CDR injertadas en el tratamiento de la artritis reumatoide. El documento US-A-5 919 452 describe anticuerpos quiméricos anti-TNF y su uso en el tratamiento de patologías asociadas con la presencia de TNF.

Se han propuesto anticuerpos contra el TNFα para la profilaxis y el tratamiento del choque endotóxico (Beutler y col., Science, 234, 470-474, 1985). Bodmer y col. (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) y Wherry y col., (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) discuten el potencial terapéutico de anticuerpos anti-TNFα en el tratamiento del choque séptico. Kirschenbaum y col., (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998) también discuten el uso de anticuerpos anti-TNFα en el tratamiento del choque séptico. La artritis inducida por colágeno puede tratarse eficazmente usando un anticuerpo monoclonal anti-TNFα (Williams y col. (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

Existen niveles elevados de TNFα tanto en el líquido

sinovial como en la sangre periférica de pacientes que sufren artritis reumatoide. Cuando se administran agentes bloqueantes de TNFα a pacientes que sufren artritis reumatoide, estos agentes reducen la inflamación, mejoran los síntomas y retrasan las lesiones de las articulaciones (McKown y col. (Arthritis Rheum, 42, 1204-1208, 1999).

En Feldman y col., (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini y col., (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) y en Feldman y col., (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997) se describe el uso de anticuerpos anti-TNFα en el tratamiento de la artritis reumatoide y de la enfermedad de Crohn. Los anticuerpos contra TNFα usados en tales tratamientos generalmente son anticuerpos quiméricos, tales como los descritos en el documento US-A-5 919 452.

Actualmente están autorizados dos productos bloqueantes de TNFα para el tratamiento de la artritis reumatoide. El primero, denominado etanercept, se comercializa por Immunex Corporation como Enbrel™. Es una proteína de fusión recombinante que comprende dos dominios p75 del receptor de TNF solubles asociados a la porción Fc de una inmunoglobulina humana. El segundo, denominado infliximab, se comercializa por Centocor Corporation como Remicade™. Es un anticuerpo quimérico que tiene dominios variables murinos anti-TNFα y dominios constantes de la IgG1 humana.

Las moléculas de anticuerpo anti-TNFα recombinante de la técnica anterior generalmente tienen una menor afinidad por el TNFα que los anticuerpos de los que proceden las regiones variables o CDR, generalmente tienen que producirse en células de mamífero y su fabricación es cara. En Stephens y col., (Immunology, 85, 668-674, 1995), y en los documentos GB-A-2 246 570 y GB-A-2 297 145 se describen anticuerpos anti-TNFα de la técnica anterior.

Existe la necesidad de una molécula de anticuerpo para tratar enfermedades inflamatorias crónicas que pueda usarse repetidamente y producirse fácil y eficazmente. También existe la necesidad de una molécula de anticuerpo que tenga alta afinidad por el TNFα y baja inmunogenicidad en los seres humanos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (como se define por Kabat y col., (supra)) que tiene la secuencia indicada como H1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 1) para CDRH1, como H2' en la Figura 3 (SEC ID NO: 2) o como H2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 7) para CDRH2, o como H3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 3) para CDRH3.

La molécula de anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende al menos una CDR seleccionada entre H1, H2' o H2 y H3 (SEC ID NO: 1; SEC ID NO: 2 o SEC ID

NO: 7 y SEC ID NO: 3) para el dominio variable de la cadena pesada. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos y más preferiblemente las tres CDR en el domino variable de la cadena pesada.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (como se define por Kabat y col., (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como L1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 6) para CDRL3.

La molécula de anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende al menos una CDR seleccionada entre L1, L2 y L3 (SEC ID NO: 4 a SEC ID NO: 6) para el dominio variable de la cadena ligera. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos y, más preferiblemente, las tres CDR en el dominio variable de la cadena ligera.

Las moléculas de anticuerpo del primer y el segundo aspectos de la presente invención preferiblemente tienen una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del primer o segundo aspecto de la presente invención comprende una

cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (como se define por Kabat y col., (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como H1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 1) para CDRH1, como H2' o H2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 7) para CDRH2 o como H3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 3) para CDRH3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (como se define por Kabat y col., (*supra*)) que tiene la secuencia indicada como L1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 6) para CDRL3.

Las CDR indicadas en la SEC ID NOS: 1 y 3 a 7 y en la Figura 3 mencionadas anteriormente proceden de un anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40. Sin embargo, la SEC ID NO: 2 consta una CDR híbrida. La CDR híbrida comprende parte de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40 (SEC ID NO: 7) y parte de la CDR2 de la cadena pesada de una secuencia de región V de la línea germinal del grupo 3 humano.

Las secuencias completas de los dominios variables del anticuerpo hTNF40 de ratón se muestran en la Figura 6 (cadena ligera) (SEC ID NO: 99) y en la Figura 7 (cadena pesada) (SEC ID NO: 100). Este anticuerpo de ratón se denomina más adelante "anticuerpo donador".

Una primera realización alternativa preferida del

primero o del segundo aspecto de la presente invención es el anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40, que tiene las secuencias de los dominios variables de cadena ligera y pesada mostradas en la Figura 6 (SEC ID NO: 99) y en la Figura 7 (SEC ID NO: 100), respectivamente. La región constante de la cadena ligera de hTNF40 es kappa y la región constante de la cadena pesada es IgG2a.

En una segunda realización alternativa preferida, el anticuerpo de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la presente invención es una molécula de anticuerpo quimérico de ratón/humano denominada en este documento molécula quimérica de anticuerpo hTNF40. La molécula quimérica del anticuerpo comprende los dominios variables del anticuerpo monoclonal de ratón hTNF40 (SEC ID NOS: 99 y 100) y los dominios constantes humanos. Preferiblemente, la molécula quimérica del anticuerpo hTNF40 comprende el dominio C kappa humano (Hieter y col., Cell, 22, 197-207, 1980; número de acceso del Genebank J00241) en la cadena ligera y los 4 dominios gamma humanos (Flanagan y col., Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada.

En una tercera realización alternativa preferida, el anticuerpo de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la presente invención es una molécula de anticuerpo con CDR injertadas. La expresión "una molécula de anticuerpo con CDR injertadas", como se usa en este documento, se refiere a una

molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una CDR híbrida) procedentes del anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en una estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano).

Preferiblemente, tal anticuerpo con CDR injertadas tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales aceptoras humanas así como una o más de las CDR del donador mencionadas anteriormente.

Cuando se injertan las CDR, puede usarse cualquier estructura apropiada de región variable del aceptor con respecto a la clase/tipo de anticuerpo donador del cual proceden las CDR, incluyendo regiones estructurales de ratón, de primate y humanas. Son ejemplos de estructuras humanas que pueden usarse en la presente invención KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat y col., (*supra*)). Por ejemplo, pueden usarse KOL y NEWM para la cadena pesada, puede usarse REI para la cadena ligera y pueden usarse EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. La regiones estructurales preferidas para la cadena ligera son las regiones estructurales humanas del grupo 1 mostradas en la Figura 1 (SEC ID NOS: 83, 85, 87 y 89). La regiones estructurales preferidas para la cadena pesada son las regiones estructurales humanas del grupo 1 y del grupo 3

mostradas en la Figura 2 (SEC ID NOS: 91, 93, 95 y 97 y SEC ID NOS: 106, 107, 108 y 109), respectivamente.

En un anticuerpo con CDR injertadas de la presente invención, se prefiere usar como anticuerpo aceptor uno que tenga cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo donador. Las cadenas pesada y ligera del aceptor no necesariamente tienen que proceder del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

Además, en un anticuerpo con CDR injertadas de la presente invención, las regiones estructurales no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, ciertos restos inusuales pueden cambiarse a restos que se producen con más frecuencia para esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, pueden cambiarse restos seleccionados en las regiones estructurales del aceptor de forma que correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador. Tales cambios deben mantenerse en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. En el documento WO 91/09967 se indica un protocolo para seleccionar los restos de las regiones estructurales del aceptor que pueden necesitar cambiarse.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas de la presente invención, si la cadena pesada del

aceptor tiene regiones estructurales humanas del grupo 1 (mostradas en la Figura 2) (SEC ID NOS: 91, 93, 95 y 97), entonces las regiones estructurales del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donador, restos del donador en las posiciones 28, 69 y 71 (de acuerdo con Kabat y col., (*supra*)).

Como alternativa, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones estructurales del grupo 1, entonces las regiones estructurales del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donador, restos del donador en las posiciones 28, 38, 46, 67, 69 y 71 (de acuerdo con Kabat y col., (*supra*)).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas de la presente invención, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones estructurales humanas del grupo 3 (mostradas en la Figura 2) (SEC ID NOS: 106, 107, 108 y 109), entonces las regiones estructurales del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donador, restos del donador en las posiciones 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73 76 y 78 (de acuerdo con Kabat y col., (*supra*)).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas de acuerdo con la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene regiones estructurales humanas del grupo 1 (mostradas en la Figura 1) (SEC ID NOS: 83, 85, 87 y 89); entonces las regiones estructurales del aceptor de la

cadena ligera comprenden restos del donador en las posiciones 46 y 60 (de acuerdo con Kabat y col., (*supra*)).

Los restos del donador son restos del anticuerpo donador, es decir, del anticuerpo del cual procedían originalmente las CDR.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una molécula completa de anticuerpo que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa; un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$ o Fv; un nonómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; un anticuerpo de una sola cadena, por ejemplo, un Fv de una sola cadena en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera están unidos por un engarce peptídico. De forma similar, las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos cuando sea apropiado.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab. Preferiblemente, el fragmento Fab tiene una cadena pesada que tiene la secuencia indicada como SEC ID NO: 111 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada como SEC ID NO: 113. Las secuencias de aminoácidos indicadas en la SEC ID NO: 111 y en la SEC ID NO: 113 preferiblemente se codifican por las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la SEC ID NO: 110 y en la SEC ID NO: 112, respectivamente.

Como alternativa, se prefiere que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o reportera. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o dos restos de cisteína a los que puede unirse la molécula efectora o reportera. Tal fragmento Fab modificado preferiblemente tiene una cadena pesada que tiene la secuencia proporcionada como SEC ID NO: 115 y la cadena ligera que tiene la secuencia proporcionada como SEC ID NO: 113. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID NO: 115 preferiblemente se codifica por la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEC ID NO: 114.

Un grupo efector preferido es una molécula polimérica, que puede unirse al fragmento Fab modificado para aumentar su vida media *in vivo*.

La molécula polimérica, en general, puede ser un polímero sintético o un polímero que se produce de forma natural, por ejemplo, un polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden

estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno más grupos hidroxi, metilo o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) o poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo. Los polímeros particulares que se producen de forma natural incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. "Derivados", como se usa en este documento, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos para tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede unirse al polímero directamente o por medio de un segmento de engarce. Se apreciará que, en algunos casos, el resto de tal grupo formará parte del producto como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse cuando se desee, pero generalmente estará en un intervalo de pesos moleculares medios de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da y, más preferiblemente, de 25000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso deseado del producto. De esta forma, por ejemplo, cuando el producto está destinado a dejar la circulación y penetrar

en un tejido, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular en el intervalo de 25000 Da a 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 25000 Da a aproximadamente 40000 Da.

Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace de sulfuro-carbono.

Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas efectoras o reporteras unidas al mismo. Las moléculas efectoras o reporteras pueden unirse al fragmento de anticuerpo a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o de cadena lateral disponible localizado en el fragmento, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o carboxilo libres.

En la preparación de los fragmentos de anticuerpo

modificados con polímeros como se han descrito anteriormente, puede usarse un polímero activado como material de partida. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α-halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, en Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado usando procedimientos químicos convencionales.

Por lo que respecta a la unión de restos de poli(etilenglicol) (PEG), se hace referencia a "Poli(etilenglicol) Chemistry, Biotechnical y Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poli(etilenglicol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o reportera, éste puede prepararse por procedimientos químicos convencionales o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la

molécula efectora o reportera antes o después de la reacción con el polímero activado según sea apropiado. Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/62331, WO 92/22583, WO 90.195 y WO 89/1476. Como alternativa, cuando la molécula efectora o reportera en una proteína o polipéptido, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como los descritos en los documentos WO 86/01533 y EP-A-0392745.

Preferiblemente, el fragmento Fab modificado de la presente invención está PEGilado (es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente) de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento EP-A-0948544. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado PEGilado como se muestra en la Figura 13. Como se muestra en la Figura 13, el fragmento Fab modificado tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un solo grupo tiol en una región de bisagra modificada. Al grupo maleimida está unido covalentemente un resto de lisina. A cada uno de los grupos amina del resto de lisina está unido un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total de la molécula efectora entera es de aproximadamente 40.000 Da.

Preferiblemente, en el compuesto mostrado en la Figura

13, la cadena pesada de la parte de anticuerpo tiene la secuencia proporcionada como la SEC ID NO: 115 y la cadena ligera tiene la secuencia proporcionada como SEC ID NO: 113. Este compuesto se denomina en este documento CDP870.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse en relación con la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones del efector que pueden requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En particular, pueden usarse dominios de la región constante de la IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando la molécula de anticuerpo está destinada para usos terapéuticos y se requieren funciones del efector del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para fines terapéuticos y no se requieren funciones del efector del anticuerpo, por ejemplo, simplemente para bloquear la actividad del TNFα.

Además, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener un efector o una molécula reportera unida a la misma. Por ejemplo, puede tener un macrociclo para quelar un átomo de metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida al mismo por una estructura de unión covalente. Como alternativa, pueden usarse procedimientos de tecnología

de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (dominios CH2, CH3 y de bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa se hayan reemplazado, o tengan unido por medio de un enlace peptídico, una proteína no inmunoglobulina funcional, tal como una enzima o una molécula de toxina.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de al menos $0,85x10^{-10}$ M, más preferiblemente de al menos $0,75x10^{-10}$ M y, aún más preferiblemente, de al menos $0,5x10^{-10}$ M. (Debe mencionarse que la molécula de anticuerpo humanizado preferida de la presente invención, como se describe más adelante, tiene una afinidad de aproximadamente $0,5x10^{-10}$ M, que es mejor que la afinidad del anticuerpo monoclonal murino del que procedía. El anticuerpo murino tiene una afinidad de aproximadamente $0,85x10^{-10}$ M.)

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable de la cadena ligera hTNF40-gL1 (SEC ID NO: 8) y el dominio variable de la cadena pesada gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas ligera y pesada se muestran en las Figuras 8 y 11, respectivamente.

La presente invención también se refiere a variantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, que

tienen mejor afinidad por TNFα. Tales variantes pueden obtenerse por varios protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de las CDR (Yang y col., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), redistribución de cadena (Marks y col., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low y col., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), redistribución del ADN (Patten y col., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), presentación de fagos (Thompson y col., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri y col., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan y col. (*supra*) discuten estos procedimientos de maduración de afinidad.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN que codifica las cadenas pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

En una realización preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena ligera y comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 (hTNF40-gL1) o en la SEC ID NO: 9 (h-TNF-40-gL2) o un equivalente degenerado de la misma.

En una realización alternativa preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena pesada y comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO: 10 (gh1hTNF40.4) o la SEC ID NO: 11

(gh3hTNF40.4) o un equivalente degenerado de la misma.

La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención también se refiere un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un vector de expresión en *E. coli* que comprende una secuencia de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de expresión es pTTO(CDP870) como se muestra esquemáticamente en la Figura 22.

La presente invención también comprende el vector pDNAbEng-G1 como se muestra en la Figura 19.

Los procedimientos generales por medio de los cuales pueden construirse los vectores, los procedimientos de transfección y los procedimientos de cultivo son bien conocidos para los especialistas en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York, y el Manual de Maniatis producido

por Cold Spring Harbor Publishing.

Las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse por procedimientos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican para parte o toda la cadena pesada y ligera del anticuerpo pueden sintetizarse cuando se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o basándose en las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN que codifica para secuencias estructurales aceptoras se puede adquirir fácilmente por los especialistas en la técnica y puede sintetizarse fácilmente basándose en sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Cuando sea apropiado, pueden usarse técnicas de mutagénesis de localización dirigida y técnicas de reacción de cadena de polimerasa (PCR).

Para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención puede usarse cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado. Pueden usarse bacterias, por ejemplo, *E. coli*, y otros

sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab y $F(ab')_2$, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo de una sola cadena, por ejemplo, Fv de una sola cadena. Pueden usarse sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpo mayores, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen CHO, células de mieloma o células de hibridoma.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para producir la expresión de una proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

Preferiblemente el procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende cultivar células *E. coli* que comprenden un vector de expresión de *E. coli* que comprende la secuencia de ADN de la presente invención en condiciones adecuadas para producir la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ADN, y aislar la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo puede secretarse de la célula o dirigirse al periplasma por

medio de secuencias señal adecuadas. Como alternativa, las moléculas de anticuerpo pueden acumularse dentro del citoplasma de la célula. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se dirige al periplasma. Dependiendo de la molécula de anticuerpo que se está produciendo y del procedimiento usado, es deseable permitir que las moléculas de anticuerpo se plieguen y adopten una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que las moléculas de anticuerpo se plieguen son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

La molécula de anticuerpo puede comprender sólo un polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera, en cuyo caso sólo necesita usarse una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar a las células huésped. Para la producción de productos que comprenden cadenas tanto pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, codificando un primer vector un polipéptido de cadena ligera y codificando un segundo vector un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, puede usarse un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

La presente invención también proporciona una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en

combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición terapéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-células T, anti-IFNγ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos, tales como xantinas.

Las composiciones farmacéuticas preferiblemente deben comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo de células o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el

intervalo de concentraciones apropiado y la vía de administración. Después, tal información puede usarse para determinar las dosis y las vías de administración útiles en los seres humanos.

La cantidad eficaz precisa para un ser humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, del peso y del sexo del sujeto, de la dieta, del tiempo y la frecuencia de administración, de la combinación de fármacos, de las sensibilidades de reacción y de la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse por medio de una experimentación rutinaria y está dentro del criterio del médico. Generalmente, una dosis eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, y, más preferiblemente, de aproximadamente 15 mg/kg. Como se muestra en los Ejemplos presentados a continuación, se han usado dosis de 1, 5 y 20 mg/kg para tratar pacientes que sufren artritis reumatoide.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de elevación en el que esté o se considere que está el nivel de TNFα a neutralizar con respecto al nivel deseable y de si la molécula de

anticuerpo se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.

De esta forma, por ejemplo, cuando el producto es para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad inflamatoria crónica, tal como la artritis reumatoide, las dosis adecuadas de la molécula de anticuerpo de la presente invención están en el intervalo comprendido entre 0,5 y 50 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 20 mg/kg y aún más preferiblemente es de aproximadamente 15 mg/kg. La frecuencia de dosificación dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto.

Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas), puede ser necesario proporcionar una o más dosis al día. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), puede ser necesario administrar sólo una dosis una vez al día, a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el receptor individual de la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolicen lentamente tales como proteínas, polipéptidos,

liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas también pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes.

Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca para reconstituirse antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones se adapten para administrarse a los seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías incluyendo, pero sin limitación, la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipopulverizadores para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La liberación directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o por liberación en el espacio intersticial de un tejido. Las

composiciones también pueden administrarse en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosificación o un programa de dosificación múltiple.

Se apreciará que ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de la degradación en el tracto gastrointestinal. De esta forma, si la composición se va a administrar por una vía usando el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo de la degradación, pero que libere el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.

En Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991) está disponible una discusión minuciosa de vehículos farmacéuticamente aceptables.

También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se administre por medio del uso de terapia génica. Para conseguir esto, se introducen secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes apropiados de ADN en un paciente, de tal forma que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se monten *in situ*.

La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TNFα.

La presente invención proporciona además el uso de la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por TNFα.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de TNFα biológicamente activo presente en el cuerpo humano o animal. El TNFα puede ser circulante en el cuerpo o puede estar presente en cualquier nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular del cuerpo.

Por ejemplo, los niveles elevados de TNFα están implicados en trastornos inmunes e inmunorreguladores agudos y crónicos, infecciones que incluyen el choque séptico, endotóxico y cardiovascular, trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades malignas y hepatitis inducida por alcohol. En el documento US-A-5 919 452 se indican detalles de los numerosos trastornos asociados con los niveles elevados de TNFα. La molécula de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse en la terapia de enfermedades mediadas por TNFα. Las enfermedades particularmente relevantes que pueden tratarse por la molécula de anticuerpo de la presente invención incluyen sepsis, insuficiencia cardíaca congestiva, choque séptico o endotóxico, caquexia, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, SIDA, alergias, psoriasis, TB, trastornos

inflamatorios de huesos, trastornos de la coagulación sanguínea, quemaduras, episodios de rechazo después de un trasplante de órganos o tejidos, enfermedad de Crohn y enfermedades autoinmunes, tales como tiroiditis, artritis reumatoide y osteoartritis.

Además, la molécula de anticuerpo o composición puede usarse: para reducir los efectos secundarios asociados con la generación de TNFα durante una terapia neoplástica; para eliminar o reducir los síntomas relacionados con el choque asociados con el tratamiento o prevención del rechazo de un injerto por medio del uso de un anticuerpo anti-linfocitos; o para el tratamiento de una insuficiencia de múltiples órganos.

La molécula de anticuerpo de la presente invención preferiblemente se usa para el tratamiento de la artritis reumatoide o de la osteoartritis.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar a los seres humanos a sujetos animales que sufren o que están en riesgo de padecer un trastorno mediado por TNFα, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo de la presente invención.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede usarse en la diagnosis, por ejemplo, en la diagnosis *in vivo* y en la formación de imágenes de estados

de enfermedad que implican niveles elevados de TNFα.

La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una CDR híbrida que comprende una secuencia de CDR del donador truncada en la que la porción que falta de la CDR donadora truncada se reemplaza por una secuencia diferente y forma una CDR funcional. El término "CDR híbrida", como se usa en este documento, significa una CDR que comprende una CDR del donador que se ha truncado en una o más posiciones, por ejemplo, en uno o en sus dos extremos. La porción que falta de la CDR del donador truncada se reemplaza por una secuencia diferente para formar una CDR completa y funcional. La CDR híbrida tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la CDR del donador completa. La secuencia que reemplaza a la porción truncada de la CDR puede ser cualquier secuencia. Preferiblemente, la parte no donadora de la secuencia de CDR procede del anticuerpo del cual proceden las regiones estructurales de la molécula de anticuerpo, tal como una secuencia de anticuerpo de línea germinal.

Se ha descubierto que las moléculas de anticuerpo que comprenden una CDR híbrida retienen sustancialmente la misma afinidad de unión que una molécula de anticuerpo que comprende las CDR del donador completas. El término "sustancialmente la misma afinidad de unión", como se usa en este documento, significa al menos un 70%, más

preferiblemente al menos un 85% y aún más preferiblemente al menos un 95% de la afinidad de unión de la molécula de anticuerpo correspondiente que comprende las CDR del donador completas. Como se ha indicado anteriormente, en ciertos casos, la afinidad del anticuerpo de la invención puede ser mayor que la del anticuerpo donador. El uso de una CDR híbrida proporciona las ventajas de reducir la cantidad de secuencia extraña (es decir, donadora) presente en la molécula de anticuerpo y puede aumentar la afinidad de unión de la molécula de anticuerpo en comparación con la molécula de anticuerpo correspondiente que comprende las CDR del donador completas.

Cualquiera de las CDR de la molécula de anticuerpo puede ser híbrida. Preferiblemente, la CDR2 de la cadena pesada es híbrida en la molécula de anticuerpo.

Preferiblemente, la truncación de la CDR del donador es de 1 a 8 aminoácidos y, más preferiblemente, de 4 a 6 aminoácidos. Además se prefiere que la truncación esté hecha en el extremo C de la CDR.

Dependiendo de la secuencia de la porción truncada de la CDR y de la secuencia de la secuencia diferente que reemplaza a la porción que falta, pueden realizarse varios cambios de aminoácido. Preferiblemente se realizan al menos dos cambios de aminoácidos, más preferiblemente se realizan al menos 3 cambios de aminoácidos y aún más preferiblemente

se realizan al menos 4 cambios de aminoácidos.

Una realización particular de este aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con un primer aspecto de la invención en el que la segunda CDR de la cadena pesada tiene la secuencia indicada como SEC ID NO: 2. Ésta tiene mejor afinidad por su antígeno que el anticuerpo donador del que procede parte de la CDR.

La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo que comprende una CDR híbrida de la presente invención.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo que comprende una CDR híbrida de la presente invención.

La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con el vector de la presente invención.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo que comprende una CDR híbrida, que comprende cultivar la célula huésped de la presente invención y aislar la molécula de anticuerpo.

La presente invención se describe adicionalmente sólo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos que hacen referencia a las Figuras adjuntas, en las que:

la Figura 1 muestra las regiones estructurales del

subgrupo 1 de cadenas ligeras humanas en comparación con las regiones estructurales de la cadena ligera de hTNF40 (SEC ID NOS: 83 a 90);

la Figura 2 muestra las regiones estructurales del subgrupo 1 y el subgrupo 3 de cadenas ligeras humanas en comparación con las regiones estructurales de la cadena pesada de hTNF40 (SEC ID NOS: 91 a 98 y 106 a 109);

la Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR de hTNF40 (SEC ID NOS: 1 a 7), siendo CDR H2' una CDR híbrida en la que los seis aminoácidos C-terminales proceden de la secuencia de CDR de H2 de un anticuerpo de línea germinal del subgrupo 3 humano y los cambios de aminoácidos en la secuencia resultante de esta hibridación esta subrayados;

la Figura 4 muestra el vector pMR15.1;

la Figura 5 muestra el vector pMR14;

la Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista del hTNF40VI murino (SEC ID NO: 99);

la figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista del hTNF40Vh murino (SEC ID NO: 100);

la Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de hTNF40-gLI (SEC ID NO: 8);

la Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de hTNF40-gL2 (SEC ID NO: 9);

la Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos y de

aminoácidos prevista de gh1hTNF40.4 (SEC ID NO: 10);

la Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11);

la Figura 12 muestra el vector CTIL5-gL6;

la Figura 13 muestra la estructura de un compuesto denominado CDP870 que comprende un fragmento Fab modificado derivado del anticuerpo hTNF40 unido covalentemente a través de un resto de cisteína a un engarce de lisil-maleimida, teniendo cada grupo amino en el resto de lisilo unido covalentemente un resto metoxi PEG, siendo n aproximadamente 420;

la Figura 14 muestra el vector pTTQ9;

la Figura 15 muestra la secuencia del adaptador oligonucleotídico OmpA (SEC ID NO: 101);

la Figura 16 muestra el vector pACYC184;

la Figura 17 muestra el vector pTTO-1;

la Figura 18 muestra el vector pTTO-2;

la Figura 19 muestra el vector pDNAbEng-G1;

la Figura 20 muestra los cassettes oligonucleotídicos que codifican diferentes secuencias intergénicas para la expresión de Fab modificada en *E. coli* (SEC ID NOS: 102 a 105);

la Figura 21 muestra la acumulación periplásmica de Fab modificados de variantes de IGS;

la Figura 22 muestra el vector pTTO (CDP870);

la Figura 23 muestra la puntuación de actividad de enfermedad (DAS) en pacientes tratados con diferentes dosis de CDP870 y placebo. Se presentan medias e intervalos IQ para la población por protocolo con la última observación tomada. Los cuadrados pequeños indican placebo, los diamantes indican 1 mg/kg, los triángulos 5 mg/kg y los cuadrados grandes indican 20 mg/kg;

la Figura 24 muestra el recuento de articulaciones sensibles, el recuento de articulaciones hinchadas, la puntuación del dolor, la evaluación global de la actividad de la enfermedad por parte del evaluador, el cuestionario de evaluación de salud modificado (HAQ), la proteína C reactiva (CRP) y la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) en pacientes tratados con diferentes dosis de CDP870 y placebo. Se presentan la media y el intervalo IQ para la población por protocolo con la última observación tomada. Los cuadrados pequeños indican placebo, los diamantes indican 1 mg/kg, los triángulos indican 5 mg/kg y los cuadrados grandes indican 20 mg/kg.

EJEMPLOS

Clonación de Genes y Expresión de una Molécula Quimérica de Anticuerpo hTNF40

Preparación de ARN a partir de Células de Hibridoma hTNF40

El ARN total se preparó a partir de 3 x 10^7 células de hibridoma hTNF40 como se describe más adelante. Las células

se lavaron en solución fisiológica salina y se disolvieron en RNAzol (0,2 ml por 10^6 células). Se añadió cloroformo (0,2 ml por 2 ml de homogeneizado), la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y después se dejó en hielo durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica resultantes se separaron por centrifugación durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf y el ARN se precipitó de la fase acuosa por medio de la adición de un volumen igual de isopropanol. Después de 15 minutos en hielo, el ARN se sedimentó por centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en agua sin RNAsa estéril. El rendimiento de ARN fue de 400 µg.

Clonación por PCR de hTNF40 Vh y Vl

Se sintetizaron secuencias de ADNc que codificaban para los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de hTNF40 usando transcriptasa inversa para producir copias de ADNc de una sola cadena del ARNm presente en el ARN total, y después se realizó una Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) sobre los ADNc con cebadores oligonucleotídicos específicos.

a) **Síntesis de ADNc**

El ADNc se sintetizó en un volumen de reacción de 20 µl que contenía los siguientes reactivos: Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, ditiotreitol 10 mM, $MgCl^2$ 3 mM, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración 0,5 mM,

20 unidades de RNAsin, 75 ng de cebador hexanucleotídico aleatorio, 2 μg de ARN de hTNF40 y 200 unidades de transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney. Después de la incubación a 42°C durante 60 minutos, la reacción se terminó por calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

b) PCR

Se sometieron alícuotas del ADNc a PCR usando combinaciones de cebadores específicos para las cadenas pesada y ligera. En las Tablas 1 y 2 se muestran, respectivamente, las secuencias de nucleótidos de los cebadores 5' para las cadenas pesada y ligera. Todas estas secuencias contienen, en orden, un sitio de restricción que se inicia a una distancia de 7 nucleótidos de sus extremos 5', la secuencia GCCGCCACC (SEC ID NO: 12), para permitir la traducción óptima de los ARNm resultantes, un codón de iniciación y 20-30 nucleótidos basados en las secuencias peptídicas directoras de anticuerpos de ratón conocidos (Kabat y col., Sequences of Proteins of immunological interest, 5ª Edición, 1991, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud).

Los cebadores 3' se muestran en la Tabla 3. El cebador de cadena ligera abarca la unión J-C del anticuerpo y contiene un sitio de restricción para la enzima Sp1I para

facilitar la clonación del fragmento VI de PCR. Los cebadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abarcar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de restricción ApaI para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta basada en las encontradas en anticuerpos de ratón conocidos (Kabat y col., 1991, *supra*).

Las combinaciones de cebadores descritas anteriormente permiten clonar directamente los productos de PCR para Vh y VI en un vector de expresión apropiado (véase más adelante) para producir cadenas pesada y ligera quiméricas (ratón-humano) y para expresar estos genes en células de mamífero y producir anticuerpos quiméricos del isotipo deseado.

Las incubaciones (100 μl) para la PCR se establecieron como se indica a continuación. Cada reacción contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 10 pmol de mezcla de cebador 5' (Tabla 4), 10 pmol de cebador 3' (CL12 (cadena ligera) o R2155 (cadena pesada) (Tabla 3)), 1 μl de ADNc y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se incubaron a 95°C durante 5 minutos y después se ciclaron por medio de tratamiento a una temperatura de 94°C durante 1 minuto, de 55°C durante 1 minuto y de 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron alícuotas de cada reacción por electroforesis en

un gel de agarosa. Las reacciones de cadena ligera que contenían mezclas de cebadores 5' de los conjuntos de cadena ligera 1, 2 y 7 produjeron bandas con tamaños consistentes con fragmentos VI de longitud completa, mientras que la reacción del conjunto 3 de reacción de cadena pesada produjo un fragmento con el tamaño esperado de un gen Vh. La banda producida por los cebadores del conjunto 1 de cadena ligera no se siguió, ya que los resultados previos habían demostrado que esta banda corresponde a un pseudogen de cadena ligera producida por la célula de hibridoma. La banda producida por los cebadores del conjunto 7 de cadena ligera fue más débil que la banda procedente de los cebadores del conjunto 2 y, por lo tanto, no se siguió. Sólo se siguió la banda del conjunto 2 de reacción de cadena ligera, que era la banda más fuerte.

c) Clonación Molecular de los Fragmentos de PCR

Los fragmentos de ADN producidos en el conjunto 2 de reacción de cadena ligera se digirieron con las enzimas BstBI y SplI, se concentraron por precipitación con etanol, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,4% y se recuperaron las bandas de ADN en el intervalo de 400 pares de basas. Éstas se clonaron por unión al vector pMR15.1 (Figura 4) que se había restringido con BstBI y SplI. Después de la unión, las mezclas se usaron para transformar células *E. coli* LM 1035 y los plásmidos de las colonias bacterianas

resultantes se seleccionaron con respecto a los insertos por digestión con BstBI y SplI. Los representantes con insertos de cada unión se analizaron adicionalmente por medio de la secuenciación de nucleótidos.

De una forma similar, los fragmentos de ADN producidos en el conjunto 3 de reacción de cadena pesada se digirieron con HindIII y ApaI y se clonaron en el vector pMR14 (Figura 5) que se había restringido con HindIII y ApaI. De nuevo, los plásmidos representativos que contenían insertos se analizaron por medio de la secuenciación de nucleótidos.

d) Análisis de la Secuencia de Nucleótidos

El ADN plasmídico de varios aislados que contenían insertos de Vh se secuenció usando los cebadores R1053 (véase la Tabla 5) (que ceba en la región 3' del promotor HCMV en pMR14) y R720 (véase la Tabla 5) (que ceba la región 5' de C-gamma 4 y permite la secuenciación a través del inserto de ADN en pMR14). Se descubrió que las secuencias de nucleótidos del inserto Vh en varios clones eran idénticas, excepto por las diferencias en el péptido señal y en las regiones J. Esto indicó que los clones examinados son aislados independientes debidos al uso de diferentes cebadores de la mezcla de oligonucleótidos durante la fase de PCR. La secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos prevista del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo hTNF40 (hTNF40Vh) se proporcionan en la Figura 7

(SEC ID NO: 100).

Para analizar los clones de la cadena ligera, se examinó la secuencia obtenida por el cebado con R1053 (véase la Tabla 5) y R684 (SEC ID NO: 62) (que ceba en la región 5' de C-kappa humana y permite la secuenciación a través del inserto de ADN en pMR15.1). También se analizaron de forma similar la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos prevista de los genes VI que proceden de las reacciones en el conjunto 2. De nuevo, se descubrió que las secuencias de nucleótidos del inserto VI en varios clones eran idénticas, excepto por las diferencias en el péptido señal y en las regiones J, lo que indica que los clones examinados eran aislados independientes debidos al uso de diferentes cebadores de la mezcla de oligonucleótidos usada durante la fase de PCR. La secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos prevista del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo hTNF40 (hTNF40VI) se proporcionan en la Figura 6 (SEC ID NO: 99).

TABLA 1

Cebadores oligonucleotídicos para la región 5' de cadenas pesadas de ratón.

CH1: 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEC ID NO:13)
CH2: 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEC ID NO:14)
CH3: 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (SEC ID NO:15)
CH4: 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEC ID NO:16)
CH5: 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEC ID NO:17)
CH6: 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEC ID NO:18)
CH7: 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEC ID NO:19)
CH8: 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEC ID NO:20)
CH9: 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEC ID NO:21)
CH10: 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT3' (SEC ID NO:22)
CH11: 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEC ID NO:23)
CH12: 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEC ID NO:24)

Cada uno de los cebadores anteriores tiene la secuencia 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEC ID NO: 25) añadida a su extremo 5'.

TABLA 2

Cebadores oligonucleotídicos para la región 5' de cadenas ligeras de ratón.

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

CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3'(SEC ID NO:34)
CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEC ID NO:35)
CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTC3' (SEC ID NO:36)
CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3'(SEC ID NO:37)
CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEC ID NO:38)
CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEC ID NO:39)
CL13 : 5'ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT3' (SEC ID NO:40)
CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEC ID NO:41)
CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEC ID NO:42)
CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEC ID NO:43)
CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEC ID NO:44)
CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEC ID NO:45)
CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEC ID NO:46)

Cada uno de los cebadores anteriores tiene la secuencia 5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEC ID NO: 47) añadida a su extremo 5'.

TABLA 3

Cebadores oligonucleotídicos para los extremos 3' de los

genes Vh y Vl de ratón.

Cadena ligera (CL12):

5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEC ID NO: 48)

Cadena pesada (R2155):

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

TABLA 4

a) Mezclas de cebadores 5' para reacciones de PCR de cadena ligera

conjunto 1: CL2.

conjunto 2: CL7.

conjunto 3: CL13.

conjunto 4: CL6.

conjunto 5: CL5A, CL9, CL17A.

conjunto 6: CL8.

conjunto 7: CL12A.

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

b) Mezclas de cebadores 5' para reacciones de PCR de cadena pesada

conjunto 1: CH1, CH2, CH3, CH4.

conjunto 2: CH5, CH6, CH7, CH8.

conjunto 3: CH9, CH10, CH11, CH12.

Tabla 5

Cebadores usados en el análisis de la secuencia de

nucleótidos

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

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

Evaluación de Actividades de Genes Quiméricos

Las actividades de los genes quiméricos se evaluaron expresándolos en células de mamífero y purificando y cuantificando los anticuerpos recién sintetizados. La metodología para esto se describe más adelante, seguida de una descripción de los ensayos bioquímicos y basados en células usados para la caracterización biológica de los anticuerpos.

a) Producción de Molécula de Anticuerpo hTNF40 Quimérica

Se produjo un anticuerpo quimérico para la evaluación biológica por medio de la expresión transitoria de los pares de cadena pesada y ligera apropiados, después de la co-transfección en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) usando precipitación con fosfato cálcico.

Un día antes de la transfección, se tripsinizaron matraces semiconfluentes de células CHO-L761, las células se contaron y los matraces T75 se prepararon, cada uno, con 10^7 células.

Al día siguiente, el medio de cultivo se cambió 3 horas

antes de la transfección. Para la transfección, se preparó el precipitado con fosfato cálcico mezclando 1,25 ml de $CaCl_2$ 0,25 M que contenía 50 µg de cada uno de los vectores de expresión de cadena pesada y ligera con 1,25 ml de 2 x HBS (16,36 g de NaCl, 11,0 g de HEPES y 0,4 g de Na_2HPO_4 en un 1 litro de agua con el pH ajustado a 7,1 con NaOH) y añadiéndose inmediatamente al medio de las células. Después de 3 h a 37°C en un incubador de CO_2, se retiraron el medio y el precipitado y las células se sometieron a un choque por medio de la adición de 15 ml de glicerol al 15% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 minuto. El glicerol se retiró, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 48-96 horas en 25 ml de medio que contenía butirato sódico 10 mM. El anticuerpo pudo purificarse del medio de cultivo por unión y elución de proteína A-Sepharose.

b) **ELISA**

Para el ELISA, se recubrieron placas ELISA Nunc durante una noche a 4°C con un fragmento $F(ab)_2$ de un anticuerpo policlonal específico de cabra anti-fragmento Fc humano (Jackson Immunoresearch, código 109-006-098) a 5 µg/ml en tampón de recubrimiento (carbonato sódico 15 mM, carbonato sódico ácido 35 mM, pH 6,9). El anticuerpo sin recubrir se retiró lavando 5 veces con agua destilada. Las muestras y los patrones purificados a cuantificar se diluyeron hasta

aproximadamente 1 µg/ml en tampón de conjugado (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, NaCl 0,1 M, Tween 20 al 0,2% v/v, caseína de Hammersten al 0,2% p/v). Las muestras se valoraron en los pocillos de microvaloración en diluciones a la mitad proporcionando un volumen final de 0,1 ml en cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Después de la primera etapa de incubación, las placas se lavaron 10 veces con agua destilada y después se incubaron durante 1 hora como se ha indicado anteriormente con 0,1 ml de un anticuerpo conjugado con peroxidasa monoclonal de ratón anti-kappa humana (clon GD12) (The Binding Site, código MP135) a una dilución de 1 en 700 en tampón de conjugado. La placa se lavó de nuevo y se añadió a cada pocillo solución de sustrato (0,1 ml). La solución de sustrato contenía 150 µl de N,N,N,N-tetrametilbencidina (10 mg/ml en DMSO), 150 µl de peróxido de hidrógeno (solución al 30%) en 10 ml de acetato sódico 0,1 M/citrato sódico, pH 6,0. La placa se reveló durante 5-10 minutos hasta que la absorbancia a 630 nm fue de aproximadamente 1,0 para el patrón superior. La absorbancia a 630 nm se midió usando un lector de placas y la concentración de la muestra se determinó comparando las curvas de valoración con las del patrón.

c) Determinación de Constantes de Afinidad por Análisis BiaCore.

La interacción de unión entre hTNF40 y TNF humano se investigó usando la tecnología BIA. Un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad, dirigido contra la región constante de hTNF40, se inmovilizó en la superficie de un chip sensor de polímero de dextrano usando la química NHS/EDC convencional. Se capturaron niveles relativamente bajos (200-500 RU) de hTNF40 para asegurar que se minimizaban los efectos del transporte de masa. Se pasó TNF humano a diferentes concentraciones sobre el hTNF40 capturado para permitir la evaluación de las cinéticas de asociación. Después de la inyección del ligando, el tampón se pasó sobre la superficie de forma que pudiera medirse la disociación. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación y disociación para la interacción entre el hTNF40 en fase sólida y el hTNF40 humano y se obtuvo un valor K_D.

EJEMPLO 1

Injerto de CDR de hTNF40

Anteriormente se ha descrito la clonación molecular de genes para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo hTNF40 y su uso para producir anticuerpos hTNF40 quiméricos (ratón-humano). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los hTNF40 VI y Vh murinos se muestran en las Figuras 6 y 7 (SEC ID NOS: 99 y 100), respectivamente. Este ejemplo describe el injerto con CDR del anticuerpo hTNF40.

Injerto con CDR de la Cadena Ligera de hTNF40

La alineación de las regiones estructurales de la cadena ligera de hTNF40 con las de los cuatro subgrupos de cadenas ligeras humanos (Kabat y col., 1991, *supra*) reveló que hTNF40 era el más homólogo a los anticuerpos del subgrupo 1 de cadenas ligeras humanas. Por consiguiente, para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones estructurales elegidas correspondían a las de la secuencia consenso del grupo 1 humano.

En la Figura 1 se proporciona una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales de hTNF40 murino y de las cadenas ligeras del grupo 1 consenso humano y demuestra que hay 22 diferencias (subrayadas) entre las dos secuencias. El análisis de la contribución que podría tener cualquiera de estas diferencias estructurales sobre la unión de antígenos identificó 2 restos para investigación; éstos están en las posiciones 46 y 60. Basándose en este análisis, se construyeron dos versiones de la cadena ligera con CDR injertada. En la primera de éstas, hTNF40-gL1 (SEC ID NO: 8), los restos 46 y 60 proceden de la cadena ligera de hTNF40, mientras que en la segunda, hTNF40-gL2 (SEC ID NO: 9), todos los restos son restos consenso humanos, excepto el resto número 60 que procede de la cadena ligera de hTNF40.

Construcción de la Cadena Ligera hTNF40-gL1 con CDR Injertada

La construcción de hTNF40-gL1 se proporciona más

adelante con detalle. En las Reacciones de Cadena de Polimerasa (PCR) se usaron los siguientes oligonucleótidos solapantes (P7982-P7986) para montar una cadena ligera injertada truncada. El fragmento montado carece de la secuencia directora del anticuerpo y de los 17 primeros aminoácidos de la estructura 1.

oligo 1 P7982:
5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAAGCCAGTCAGAACGTAGGTACTAAC GTAGCCTGGTATCAGCAAA3' (SEC ID NO:52)

oligo 2 P7983:
5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTTACCTGGTTT TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEC ID NO:53)

oligo 3 P7984:
5' TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTCAGCGGATCCG GTAGTGGTACTGATTTCAC3' (SEC ID NO:54)

oligo 4 P7985
5'GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGATCGTGAGGGT GAAATCAGTACCACTACCG3' (SEC ID NO:55)

oligo 5 P7986:
5'ATTTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCGGT CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEC ID NO:56)

Fwd P7981:
5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAAGCC3' (SEC ID NO:57)

Bwd P7980

5'GAATTCCGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT3' (SEC ID NO:58),

Se preparó una relación de PCR, de 100 µl, que contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 2 pmol de P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 pmol de P7980, P7981 y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por tratamiento a una temperatura de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, cada reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento de PCR se escindió del gel y se recuperó usando un estuche Mermaid. El fragmento recuperado se restringió con las enzimas BstEII y SplI en el tampón apropiado. El producto resultante finalmente se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento de ADN de 270 pares de bases se recuperó del corte del gel y se unió al vector CTIL5-gL6 (Figura 12), que previamente se había digerido con las mismas enzimas. El vector anterior proporciona la secuencia directora del anticuerpo y los 17 primeros aminoácidos de la estructura 1 que faltan.

La mezcla de unión se usó para transformar la cepa LM1035 de E. coli y las colonias resultantes se analizaron por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación

de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la región VI de hTNF40-gL1 se muestra en la Figura 8 (SEC ID NO: 8).

Construcción de la Cadena Ligera hTNF40-gL2 con CDR Injertada

hTNF40-gL2 (SEC ID NO: 9) se construyó usando PCR. Para introducir los cambios de aminoácidos, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

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

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

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

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

Se prepararon dos reacciones, cada una de 20 µl, que contenían Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 0,1 µg de hTNF40-gL1, 6 pmol de R1053/R5350 o R5349/R684 y 0,25 unidades de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por medio del tratamiento a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, cada reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa

y los fragmentos de PCR se escindieron del gel y se recuperaron usando un estuche Mermaid.

Después se sometieron alícuotas de estas reacciones a una segunda vuelta de PCR. La reacción, de 100 µl, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, 1/5 de cada uno de los fragmentos de PCR de la primera serie de reacciones, 30 pmol de R1053 y R684 y 2,5 unidades de Taq polimerasa. Las temperaturas de reacción fueron como se han indicado anteriormente. Después de la PCR, la mezcla se extrajo con fenol/cloroformo y después con cloroformo y se precipitó con etanol. El precipitado de etanol se recuperó por centrifugación, se disolvió en el tampón apropiado y se restringió con las enzimas BstEII y SplI. El producto resultante finalmente se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento de ADN de 270 pares de basas recuperado a partir de un corte de gel se unió al vector pMR15.1 (Figura 4) que previamente se había digerido con las mismas enzimas.

La mezcla de unión se usó para transformar la cepa LM1035 de E. coli y las colonias resultantes se analizaron por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la región VI de hTNF40-gL2 se muestra en la Figura 9 (SEC ID NO: 9).

Injerto con CDR de la Cadena Pesada de hTNF40

El injerto con CDR de la cadena pesada de hTNF40 se realizó usando la misma estrategia que se ha descrito para la cadena ligera. Se descubrió que la cadena pesada de hTNF40 era la más homóloga a las cadenas pesadas humanas pertenecientes al subgrupo 1 y, por lo tanto, se eligió la secuencia consenso de las estructuras del subgrupo 1 humano para aceptar las CDR de la cadena pesada de hTNF40.

Para investigar el requisito de una estructura humana homóloga para actuar como estructura aceptora para el injerto de CDR, se seleccionó una segunda estructura, del grupo 3 humano, para humanizar la cadena pesada de hTNF40.

En la Figura 2 se muestra una comparación de hTNF40 con las dos regiones estructurales diferentes, en la que se puede ver que hTNF40 difiere del consenso del subgrupo 1 humano en 32 posiciones (subrayadas) y difiere del consenso del subgrupo 3 humano en 40 posiciones (subrayadas). Después del análisis de la contribución que podía hacer cualquiera de estas diferencias a la unión del antígeno, se retuvieron los restos 28, 38, 46, 67, 69 y 71 como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gh1hTNF40.1 usando la estructura del grupo 1. Los restos 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 y 78 se retuvieron como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gh3hTNF40.4 usando la estructura del grupo 3. Los restos 28, 69 y 71 se retuvieron como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gh1hTNF40.4 usando la estructura del

grupo 1.

Construcción de la Cadena Pesada Injertada con CDR gh1hTNF40.4

gh1hTNF40.4 (SEC ID NO: 10) se montó sometiendo oligonucleótidos solapantes a PCR en presencia de los cebadores apropiados. En la PCR se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Injerto del grupo 1

oligo 1 P7989:
5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG AGTGCACGAATTC3' (SEC ID NO:63)

oligo 2 P7990:
5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC GTGTTCACAGACTATGGTA3' (SEC ID NO:64)

oligo 3 P7991:
5'CCAACCCATCCATTTCAGGCCTTGTCCCGGGGCCTGCTTGACCCAATTCATAC CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEC ID NO:65)

oligo 4 P7995:
5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEC ID NO:66)

oligo 5 P7992:
5'CCATGTATGCAGTGCGTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTT GAA3' (SEC ID NO:67)

oligo 6 P7993:
5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCGC AGTGTACTAT3' (SEC ID NO:68)

oligo 7 P7994:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEC ID NO:69)

Fwd: P7988:
5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (SEC ID NO:70)

Bwd P7987:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEC ID NO:71)

La reacción de montaje, de 100 μl, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 2 pmol de cada uno de p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 y p7994, 10 pmol de cada uno de p7988 y p7987 y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por tratamiento a una temperatura de 94°C durante 1 minuto, de 55°C durante 1 minuto y de 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, la reacción se extrajo con fenol/cloroformo (1/1), después con cloroformo y se precipitó con etanol. Después de la centrifugación, el ADN se disolvió en el tampón de restricción apropiado y se digirió con ApaL1 y KpnI. El fragmento resultante se aisló en un gel de agarosa y se unió a pMR14 (Figura 5), que previamente se había digerido con las

mismas enzimas. pMR14 contiene la región constante de la cadena pesada gamma 4 humana. Cuando pMR14 se escinde con ApaLI y KpaI, el vector escindido es capaz de recibir el ADN digerido de tal forma que el extremo 3' del ADN digerido se una en fase de lectura al extremo 5' de la secuencia que codifica la región constante gamma 4. Por lo tanto, la cadena pesada expresada a partir de este vector será un isotipo gamma 4. La mezcla de unión se usó para transformar *E. coli* LM1035 y las colonias bacterianas resultantes se seleccionaron por digestión de restricción y por análisis de la secuencia de nuecleótidos. De esta forma, se identificó un plásmido que contenía la secuencia correcta para gh1hTNF40.4 (Figura 10) (SEC ID NO: 10).

Construcción de la Cadena Pesada Injertada con CDR gh3hTNF40.4

gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11) se montó sometiendo oligonucleótidos solapantes a PCR en presencia de los cebadores apropiados. En la PCR se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Injerto del grupo 3

oligo 1 P7999:
5'GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCTGAACCTCAG
AGTGCACGAATTC3' (SEC ID NO:72)

oligo 2 P8000:
5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCTGGTTACG
TCTTCACAGACTATGGAA3' (SEC ID NO:73)

oligo 3 P8001
5'CCAACCCATCCATTTCAGGCCCTTTCCCGGGGCCTGCTTAACCCAATTCATTC
CATAGTCTGTGAAGACGT3' (SEC ID NO:74)

oligo 4 P7995:
5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEC ID NO:66)

oligo 5 P7997:
5'GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGAATCTGCCCTT
GAA3' (SEC ID NO:75)

oligo 6 P7998:
5'CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC
AGTGTACTAT3' (SEC ID NO:76)

oligo 7 P7993:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEC ID NO:77)

Fwd P7996:
5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTCAGCTGGTC3' (SEC ID NO:78)

Bwd P7987:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEC ID NO:71)

La reacción de montaje, de 100 μl, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 2 pmol de cada uno de p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 y p7993, 10 pmol de cada uno de p7996 y p7987 y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por tratamiento a una temperatura de 94°C durante 1 minuto, de 55°C durante 1 minuto y de 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, la reacción se extrajo con fenol/cloroformo (1/1), después con cloroformo y se precipitó con etanol. Después de la centrifugación, el ADN se disolvió en el tampón de restricción apropiado y se digirió con ApaLI y KpnI. El fragmento resultante se aisló en un gel de agarosa y se unió a pMR14 (Figura 5), que previamente se había digerido con las mismas enzimas. pMR14 contenía la región constante de la cadena pesada gamma 4 humana. Cuando pMR14 se escinde con ApaLI y KpaI, el vector escindido es capaz de recibir el ADN

digerido de tal forma que el extremo 3' del ADN digerido se una en fase de lectura al extremo 5' de la secuencia que codifica la región constante gamma 4. Por lo tanto, la cadena pesada expresada a partir de este vector será un isotipo gamma 4. La mezcla de unión se usó para transformar *E. coli* LM1035 y las colonias bacterianas resultantes se seleccionaron por digestión de restricción y por análisis de la secuencia de nucleótidos. De esta forma, se identificó un plásmido que contenía la secuencia correcta para gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11) (Figura 11).

Producción del Fragmento Fab Modificado con CDR Injertada

Se construyó un fragmento Fab modificado, con CDR injertada, basándose en el anticuerpo hTNF40, usando el vector de *E. coli* pTTO-1. Las regiones variables del anticuerpo hTNF40 se subclonaron en este vector y la secuencia intergénica se optimizó para crear pTTO(CD870). El vector de expresión pTTO está diseñado para producir la acumulación periplásmica, soluble, de proteínas recombinantes en *E. coli*. Las características principales de este plásmido son:

(i) marcador de resistencia a tetraciclina - antibiótico no inactivado por el producto del gen de resistencia, por lo tanto, se mantiene la selección de las células que contienen el plásmido;

(ii) bajo número de copias - origen de replicación

derivado del plásmido p15A, que es compatible con plásmidos que contienen replicones derivados de colE1;

(iii) promotor tac fuerte inducible para la transcripción de genes clonados;

(iv) gen $lacI^q$ - proporciona la expresión constitutiva de la proteína represora lac, manteniendo al promotor tac en el estado reprimido hasta la inducción con IPTG/alolactosa;

(v) secuencia señal de OmpA - proporciona la secreción periplásmica de los genes clonados;

(vi) acoplamiento traduccional de la secuencia señal de OmpA a un péptido lacZ corto, proporcionando una iniciación eficaz de la traducción.

El vector se ha creado para la expresión de fragmentos Fab modificados a partir de un mensajero dicistrónico por el diseño de un procedimiento para seleccionar empíricamente la secuencia intergénica óptima de una serie de 4 cassettes construidos para tal fin. Se describe la aplicación de esto en la construcción de pTTO(CDP870).

Materiales y Métodos

Técnicas de ADN

Para los protocolos se usaron procedimientos convencionales, incluyendo restricción de ADN, electroforesis en gel de agarosa, unión y transformación. Las enzimas de restricción y las enzimas de modificación del ADN se obtuvieron en New England Biolabs o Boehringer Mannheim, y

se usaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los fragmentos de ADN se purificaron en agarosa usando el protocolo GeneClean (BIO 101). Los oligonucleótidos se suministraron por el Oswel Oligonucleotide Service y se sintetizaron a la escala de 40 nm. El ADN plasmídico se aisló usando estuches de ADN Plasmídico Mini/Midi de Qiagen. La PCR se realizó usando "Amplitaq" de Perkin Elmer como se recomienda. La secuenciación del ADN se realizó usando el estuche de secuenciación de ciclos Taq de Applied Biosystems.

Inducción de matraces de agitación

Se desarrollaron cultivos de *E. coli* W3110 en caldo L suplementado con tetraciclina (7,5 µg/ml). Para las inducciones, se diluyeron cultivos de una noche recientes (desarrollados a 30°C) a una DO_{600} de 0,1 en 200 ml de caldo L en un matraz de 2 litros tabicado y se dejaron crecer a 30°C en una incubador orbital. A una DO_{600} de 0,5, se añadió IPTG a una concentración de 200 µM. Se tomaron muestras (normalizadas para DO) a intervalos.

Extracción Periplásmica

Se enfriaron en hielo muestras de cultivo (5 minutos), y después las células se recogieron por centrifugación. Después de la resuspensión en tampón de extracción (Tris.HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4), las muestras se incubaron durante una noche a 30°C y después se clarificaron por centrifugación.

Ensayo de Montaje

Las concentraciones de Fab modificado se determinaron por medio de un ELISA. Las placas se recubrieron a 4°C durante una noche con anti-Fd 6045 humano (2 µg/ml en tampón de recubrimiento, solución fisiológica salina, 100 µl por pocillo). Después del lavado, se introdujeron 100 µl de muestra por pocillo; como patrón se usó Fab' gamma-1 A5B7 purificado, inicialmente a una concentración de 2 µg/ml. Las muestras se diluyeron en serie a la mitad a lo largo de la placa en tampón de conjugado de muestra (por litro: 6,05 g de trisaminometano; 2,92 g de NaCl; 0,1 ml de Tween-20; 1 ml de caseína (0,2%)); las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron y se secaron, y después se añadieron 100 µl de anti-C-kappa (GD12)-peroxidasa humana (diluido en tampón conjugado de muestra). La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Las placas se lavaron y se secaron, y después se añadieron 100 µl de solución de sustrato (10 ml de solución de acetato sódico/citrato (0,1 M pH 6); 100 µl de solución de H_2O_2; 100 µl de solución de tetrametilbencidina (10 mg/ml en dimetilsufóxido)). La absorbancia a 630 nm se leyó 4 - 6 minutos después de la adición del sustrato.

Construcción del Plásmido pTTO-1

(a) Reemplazo del Poliengarce pTTQ9

El plásmido pTTQ9 se obtuvo en Amersham y se muestra en la Figura 14. Una alícuota (2 μg) se digirió con enzimas de restricción SalI y EcoRI, el producto de digestión se llevó a un gel de agarosa al 1% y se purificó el fragmento grande de ADN (4520 pb). Se sintetizaron dos oligonucleótidos que, cuando se templan conjuntamente, codifican la región de poliengarce de OmpA mostrada en la Figura 15. Esta secuencia tiene extremos cohesivos que son compatibles con los extremos SalI y EcoRI generados por restricción de pTTQ9. Por clonación de este "cassette" de oligonucleótido en el vector pTTQ9 no se regenera el sitio SalI, pero se mantiene el sito EcoRI. El cassette codifica los primeros 13 aminoácidos de la secuencia señal de la proteína de membrana externa de *E. coli* Omp-A, precedidos por el sitio de unión a ribosomas de Shine Dalgano del gen OmpA. Además, están presentes sitios de restricción para las enzimas XbaI, MunI, StyI y SplI. Los sitios MunI y StyI están dentro de la región codificante de la secuencia señal de OmpA y pretenden ser los sitios de clonación 5' para la inserción de genes. Los dos oligonucleótidos que constituyen este cassette se templaron mezclándolos a una concentración de 5 pmol/μl y calentándolos en un baño de agua a 95°C durante 3 minutos, y después enfriando lentamente a temperatura ambiente. Después, la secuencia templada se unió a pTTQ9 cortado con SalI/EcoRI.

El intermedio plasmídico resultante, denominado pTQOmp, se verificó por secuenciación del ADN.

(b) Preparación y Unión de Fragmentos

El plásmido pTTO-1 se construyó uniendo un fragmento de ADN del plásmido pACYC184 a dos fragmentos generados a partir de pTQOmp. El plásmido pACYC184 se obtuvo en New England Biolabs, y en la Figura 16 se muestra un mapa de restricción. Una alícuota (2 μg) se digirió completamente con la enzima de restricción StyI y después se trató con Nucleasa Mung Bean; este tratamiento crea extremos romos por corte de las bases 5' salientes. Después de la extracción con fenol y de la precipitación con etanol, el ADN se restringió con la enzima PvuII, generando fragmentos de 2348, 1081, 412 y 403 pb. El fragmento de 2348 pb se purificó después de electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento codifica el marcador de resistencia a tetraciclina y el origen de replicación de p15A. Después, el fragmento se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero para eliminar los fosfatos 5' terminales, impidiendo de esta manera la auto-unión de esta molécula.

Una alícuota (2 μg) del plásmido pTQOmp se digirió con enzimas SspI y EcoRI, y el fragmento de 2350 pb se purificó de los fragmentos indeseados de 2040 pb y 170 pb por electroforesis en gel de agarosa; este fragmento codifica la región terminadora de la transcripción y el gen $lacI^q$. Otra

alícuota (2 μg) de pTQO se digirió con EcoRI y XmnI, generando fragmentos de 2289, 1670, 350 y 250 pb. El fragmento de 350 pb, que codifica el promotor tac, la secuencia señal de OmpA y el sitio de multiclonación, se purificó en gel.

Después se unieron los tres fragmentos usando cantidades aproximadamente equimolares de cada fragmento, para generar el plásmido pTTO-1. Todas las uniones de clonación se verificaron por secuenciación del ADN. El mapa de restricción de este plásmido se muestra en la Figura 17. Después se creó el plásmido pTTO-2 por inserción de ADN que codificaba el dominio constante kappa de la cadena ligera de la Ig humana. Éste se obtuvo como un fragmento de restricción SplI-EcoRI a partir del plásmido pHC132, y se insertó en los sitios correspondientes en pTTO-1. El plásmido pTTO-2 se muestra en la Figura 18.

Inserción de regiones variables de hTNF40 humanizado en pTTO-2

La región variable de la cadena ligera de hTNF40gL1 (SEC ID NO: 8) se obtuvo por "rescate" de PCR desde el vector correspondiente para la expresión en células de mamífero, pMR10.1. La secuencia directora de OmpA reemplaza a la secuencia directora de la Ig nativa. La secuencia de los cebadores de PCR se muestra a continuación:

cebador 5':

CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAG
CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEC ID NO:79)

cebador 3':

TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEC ID NO:80)

Después de una PCR en condiciones convencionales, el producto se purificó, se digirió con enzimas MunI y SplI y después se purificó en gel. El fragmento purificado después se insertó en los sitios MunI/SplI de pTTO-2 para crear el intermedio de cadena ligera pTTO(hTNF40L).

La región variable de la cadena pesada de gh3hTNF40.4 se obtuvo de la misma forma a partir del vector pGamma-4. La secuencia de los cebadores de PCR se muestra a continuación:

cebador 5':

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG
CTGAGGTTCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEC ID NO:81)

cebador 3':

GCCTGAGTTCCACGACAC (SEC ID NO:82)

Después de la PCR, el producto se purificó, se digirió con las enzimas NheI y ApaI y después se sub-clonó en el vector pDNAbEng-G1 (Figura 19). Después de la verificación

por secuenciación del ADN, la cadena pesada se restringió con la enzima EcoRI y se sub-clonó en el sitio EcoRI de pTTO(hTNF40L) para crear el plásmido de expresión de *E. coli* pTTO(hTNF40).

Optimización de la Secuencia Intergénica para la Expresión de Fab Modificado

En el vector pTTO, la expresión del Fab modificado se produce a partir de un mensajero dicistrónico que codifica primero la cadena ligera y después la cadena pesada. La secuencia de ADN entre los dos genes (secuencia intergénica, IGS) puede influir sobre el nivel de expresión de la cadena pesada afectando a la velocidad de iniciación de la traducción. Por ejemplo, una secuencia intergénica corta puede ocasionar un acoplamiento de traducción entre las cadenas ligera y pesada, ya que el ribosoma de traducción puede no disociar completamente el ARMn después de completar la síntesis de la cadena ligera antes de iniciar la síntesis de la cadena pesada. La "fuerza" de cualquier sitio de unión a ribosomas de Shine Dalgarno (SD) (homología con el ARNr 16S) también puede tener un efecto, así como la distancia y la composición de la secuencia entre el SD y el codón de iniciación ATG. La estructura secundaria potencial del ARNm alrededor del ATG es otro factor importante; el ATG debe estar en un "bucle" y no limitado dentro de un "tramo recto", mientras que se aplica lo contrario al SD. De esta manera,

modificando la composición y la longitud del IGS, es posible modificar la fuerza de iniciación de la traducción y, por lo tanto, el nivel de producción de cadena pesada. Es probable que necesite conseguirse una velocidad óptima de iniciación de la traducción para maximizar la expresión de la cadena pesada de un Fab modificado dado. Por ejemplo, con un Fab modificado, puede tolerarse un alto nivel de expresión, pero para un Fab modificado diferente con una secuencia de aminoácidos diferente, un alto nivel de expresión podría resultar tóxico, quizás a causa de las diferentes eficacias de secreción o plegamiento. Por esta razón, se diseñó una serie de cuatro secuencias intergénicas (Figura 20), permitiendo la determinación empírica de la IGS óptima para los Fab modificados basados en hTNF40. IGS1 e IGS2 tienen secuencias intergénicas muy cortas (-1 y +1 respectivamente) y sería de esperar que proporcionaran una traducción muy acoplada; las secuencias SD (subrayadas) son sutilmente diferentes. Lo más probable es que estas dos secuencias confieran un alto nivel de iniciación de la traducción. IGS3 e IGS4 tienen una mayor distancia entre los codones de iniciación y de parada (+13) y difieren en su composición de secuencia; IGS3 tiene una secuencia SD "más fuerte". En todas las secuencias se estudió la estructura secundaria (usando el programa m/fold) y se "optimizaron" tanto como fue posible; sin embargo, con un fuerte acoplamiento de

traducción de las dos cadenas, la ausencia de disociación ribosómica significa que el ARNm puede no estar "expuesto", impidiendo la formación de la estructura secundaria.

Clonación de variantes de IGS

Los cassettes IGS mostrados en la Figura 20 tienen sitios de clonación SacI y MunI flanqueantes. Se construyeron templando pares de oligonucleótidos complementarios. Se preparó un fragmento de vector digiriendo pTTO(hTNF40) con SacI y NotI y se preparó un fragmento de cadena pesada digiriendo pDNAbEngG1(hTNF40H) con MunI y NotI. Después se realizaron uniones de 3 vías, usando cantidades equimolares de los dos fragmentos de restricción y aproximadamente 0,05 pmol de cada cassette de oligonucleótido templado. De esta forma se crearon los cuatro plásmidos de expresión pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3) y pTTO(hTNF40 IGS-4).

Análisis de expresión en matraz de agitación

Los cuatro plásmidos se utilizaron para transformar la cepa W3110 de *E. coli* junto con la construcción de expresión original, y después esta cepa se analizó con respecto a la expresión en matraces de agitación como se ha descrito anteriormente. En la Figura 21 se muestran los resultados de un experimento típico. Las diferentes secuencias intergénicas confieren diferentes perfiles de expresión. IGS1 e IGS2 acumulan Fab modificado periplásmico rápidamente,

observándose un pico una hora después de la inducción, después de lo cual disminuye el nivel recuperado. En el caso de IGS1 el pico es mayor y la caída más aguda. Estos resultados son coherentes con un alto nivel de síntesis, como era de esperar por el estricto acoplamiento traduccional para estas construcciones. Aparentemente, IGS1 confiere un mayor nivel de expresión de cadena pesada que IGS2. En este caso, parece ser que este alto nivel de expresión se tolera mal, ya que los niveles de expresión periplásmicos se reducen después del pico de 1 hora. Esto se observa en el perfil de crecimiento del cultivo de IGS1 (no mostrado), que muestra picos 1 hora después de la inducción antes de la disminución, lo que sugiere muerte y lisis celular. IGS3 acumula Fab modificado más lentamente, pero alcanza picos 2 horas después de la inducción observándose un pico mayor (325 nm/ml/DO) antes de que se reduzcan los niveles. El crecimiento de este cultivo continuó hasta 3 horas después de la inducción y alcanzó una biomasa pico mayor (no mostrada). Esto es coherente con un nivel menor de síntesis de cadenas pesadas. IGS4 acumula material a una velocidad más lenta y no puede alcanzar el pico elevado de productividad de las otras tres construcciones. Todas las variantes de IGS superan al vector original significativamente. La hipótesis de que las diferentes secuencias de IGS confieren diferentes velocidades de iniciación de la traducción se confirma por estos

resultados experimentales. Para el Fab modificado basado en hTNF40, parece ser que una alta velocidad de iniciación de la traducción de la cadena pesada se tolera mal y, por lo tanto, no es óptima. Una velocidad más lenta, como la conferida por IGS3, proporciona mejores características de crecimiento y, por consiguiente, se acumula un mejor rendimiento a lo largo del tiempo.

Después de la comparación de la productividad en el fermentador, se seleccionó la construcción IGS3 como la que producía el mayor rendimiento y se denominó pTTO(CDP870)- véase la Figura 22.

La cadena pesada codificada por el plásmido pTTO(CDP870) tiene la secuencia indicada en la SEC ID NO: 115 y la cadena ligera tiene la secuencia indicada en SEC ID NO: 113.

PEGilación de Fab Modificado Basado en hTNF40 con CDR Injertada

El Fab modificado purificado se conjuga, de una forma específica para la localización, con una molécula ramificada de PEG. Esto se consigue por activación de un solo resto de cisteína en una región de bisagra truncada del Fab modificado, seguida de la reacción con (PEG)-lisil maleimida como se ha descrito previamente (A.P. Chapman y col., Nature Biotechnology 17 780-783; 1999). La molécula PEGilada se muestra en la Figura 13 y se denomina compuesto CDP870.

Eficacia del Fab Modificado Basado en hTNF40 con CDR

Injertada PEGilado (CDP870) en el Tratamiento de la Artritis Reumatoide.

CDP870 tiene una vida media prolongada de aproximadamente 11 días.

Los presentes solicitantes evaluaron la seguridad y la eficacia del CDP870 intravenoso en un ensayo de aumento de la dosis aleatorio, doble ciego, controlado con placebo, realizado en pacientes con RA.

Métodos

Pacientes:

Se reclutaron pacientes con edades comprendidas entre los 18 y los 75 años y que cumplían el criterio de diagnóstico del American College of Rheumatology (ACR), revisado en 1987, para la artritis reumatoide (RA) (Arnett y col., Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988), de clínicas externas de reumatología de Londres, Cambridge, Norfolk y Norwich (Reino Unido). Se requería que los pacientes tuvieran la enfermedad clínicamente activa, como se define por tener al menos 3 de los siguientes criterios: ≥ 6 articulaciones sensibles o dolorosas; ≥ 45 minutos de rigidez por la mañana temprano; y una velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) ≥ 28 mm/h. Se requiere que estos pacientes hayan fracasado en la respuesta a al menos un Fármaco Anti-Reumático Modificador de la Enfermedad (DRARD) y que hayan estado sin tratamiento durante al menos cuatro semanas. Se

permitió la administración de corticosteroides si la dosis era ≥ 7,5 mg/día de prednisolona. Se excluyeron las mujeres embarazadas, las mujeres en período de lactancia y las mujeres en edad fértil que no usaban un método anticonceptivo eficaz. También se excluyeron los pacientes si habían tenido una historia previa de malignidad, afecciones médicas graves concomitantes incontroladas, fracaso previo de una terapia neutralizadora de TNFα o alergia a polietilenglicol. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de cada paciente antes de la inclusión. El estudio se aprobó por el comite de ética de investigación local.

Protocolo de tratamiento:

36 pacientes RA se dividieron en 3 grupos, cada uno para recibir una dosis creciente del fármaco de ensayo (1, 5 o 20 mg/kg). Cada grupo de 12 se dividió aleatoriamente en 8 para recibir CDP870 y 4 para recibir placebo. El CDP870 se administró como una sola infusión ultravenosa (100 ml en total) durante 60 minutos. El placebo (tampón acetato sódico) se administró de forma similar como una sola infusión intravenosa de 100 ml durante 60 minutos. El tratamiento se administró en una base de pacientes externos. Después de 8 semanas, todos los pacientes tuvieron la oportunidad de recibir una infusión de 5 ó 20 mg/kg de CDP870 de una forma descubierta.

Evaluación clínica:

La actividad de la enfermedad RA se evaluó basándose en las series de datos centrales de la Organización Mundial de la Salud, de la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología (Boers y col., J. Rheumatol- Supplement, 41, 86-89, 1994) y de la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) (Scott y col., Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) con 28 articulaciones. Los cambios en la actividad de la enfermedad se evaluaron por la Puntuación de la Actividad de la Enfermedad (Prevoo y col., Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) y los criterios de respuestas ACR (Felson y col., Arthritis Rheum.; 38, 727-735, 1995). Las evaluaciones se realizaron antes del tratamiento y 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de la terapia. En los pacientes también se evaluó la seguridad y la tolerancia del fármaco de estudio. En cada visita se evaluaron la hematología, la bioquímica, los anticuerpos anti-CDP870 y los acontecimientos adversos.

Concentración de CDP870 en plasma y anticuerpos anti-CDP870:

CDP870 se midió por el ensayo de inmunoabsorbente con enzima unida (ELISA). Se incubaron diluciones en serie del plasma de los pacientes en placas de microvaloración (Nunc) recubiertas con TNFα humano recombinante (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). El CDP870 capturado se reveló con anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (Cappel, ICN) seguido de sustrato de tetrametilbencidina (TMB).

Los anticuerpos contra CDP870 se seleccionaron (a una dilución de plasma de 1/10) usando un ELISA de sandwich de doble antígeno con CDP870 biotinilado como segunda capa. Los anticuerpos unidos se revelaron usando HRP-estreptavidina y sustrato de TMB. El ensayo se calibró usando un patrón de IgG de conejo hiperinmune. Una unidad de actividad es equivalente a 1 μg del patrón de conejo.

Análisis estadístico

El estudio fue de naturaleza exploratoria y el tamaño de la muestra se basó en la experiencia previa con agentes similares. La eficacia de CDP870 se analizó calculando la puntuación de actividad de la enfermedad (DAS) y las respuestas ACR20/50 para la intención del tratamiento y por protocolo, usando un procedimiento de ensayo cerrado. La puntuación de la actividad de la enfermedad se calculó como se indica a continuación: DAS = 0,555 x raíz cuadrada de (28 articulaciones sensibles) + 0,284 x raíz cuadrada de (28 articulaciones hinchadas) + 0,7 x ln(ESR) + 0,0142 x (evaluación global del paciente). En primer lugar se compararon los grupos activos reunidos con el placebo. Si esta comparación era significativa a un nivel del 5%, cada grupo de dosificación se comparó con el placebo. Todas las comparaciones fueron bilaterales con un nivel significación del 5%. Todos los valores P procedían del análisis exploratorio y no deben usarse para la interpretación

inferencial.

Resultados

Demografía:

Se reclutaron 36 pacientes con RA. Sus detalles demográficos se proporcionan en la Tabla 6. La edad media era de 56 años y 30 pacientes eran mujeres. La duración media de la RA era 13 años y 21 pacientes eran positivos para el factor reumatoide. Los pacientes de los diferentes grupos tienen características demográficas similares. En el período de dosificación ciego, 6/12 pacientes tratados con placebo abandonaron el estudio por una RA progresiva ≥ 4 semanas después de la dosificación. 2/24 pacientes tratados con CDP870 abandonaron el estudio, los dos del grupo de 1 mg/kg, por una RA progresiva/pérdida del seguimiento > 4 semanas después de la dosificación. La diferencia fue estadísticamente significativa (p=0,009, ensayo exacto de Fisher).

Tabla 6: Detalles demográficos (media ± desviación típica)

	Número	Sexo (M:F)	Edad	Duración Enfermedad	Factor Reumatoide	Número de DMARD previos
Placebo	12	1:11	51±8	12±8	8(67%)	5±1
1 mg/kg	8	1:7	59±7	12±7	4(50%)	4±1
5 mg/kg	8	2:6	54±13	13±5	5(63%)	5±2

20mg/kg	8	2:6	61±11	14±13	4(50%)	4±2

Eficacia Clínica:

La proporción de pacientes con mejoría de ACR20 para la población por protocolo con la última observación realizada fue del 16,7, 50, 87,5 y 62,5%, después de la administración del placebo, 1, 5 y 20 mg/kg de CDP870 (efecto de tratamiento combinado p=0,012) a las 4 semanas, y del 16,7, 25, 75 y 75% (p=0,032) a las 8 semanas. La reducción en las puntuaciones DAS (media) para la población por protocolo con la última observación realizada fue de 0,15, 1,14, 1,91 y 1,95 después del placebo, 1, 5 y 20 mg/kg de CDP870 (efecto de tratamiento combinado p=0,001) a las 4 semanas y de 0,31, 0,09, 2,09 y 1,76 (p=0,008) a las 8 semanas (Figura 23). En la Figura 24 se muestran los cambios en los componentes individuales de la serie de datos centrales de la Organización Mundial de la Salud y la Liga Internacional de Asociaciones para Reumatología.

Después de la dosis descubierta de CDP870, se consiguieron efectos beneficiosos similares. De los 36 pacientes reclutados en el estudio, 32 recibieron una segunda infusión de CDP870. La proporción de pacientes con mejoría de ACR20 desde antes de la primera infusión, después de la administración de 5 y 20 mg/kg de CDP870, fue del 72,2 y del 55,6% a las 4 semanas y del 55,6 y del 66,7% a las 8 semanas.

Acontecimientos Adversos

El tratamiento fue bien tolerado sin reacciones relacionadas con la infusión. No se identificó ninguna reacción alérgica ni exantema cutáneo. En la fase doble ciego, hubo 19, 38, 8 y 14 acontecimientos adversos en los grupos de placebo, 1, 5 y 20 mg/kg, respectivamente. Los acontecimientos adversos más comunes fueron dolor de cabeza, con 9 episodios en 5 pacientes (1 placebo, 3 a 1 mg/kg y 1 a 20 mg/kg). Un paciente que recibió placebo y tres pacientes que recibieron CDP870 (1 a 5 mg/kg y 2 a 20 mg/kg) desarrollaron infecciones del tracto respiratorio inferior. Estos acontecimientos se consideraron leves o moderados. Se trataron con antibióticos orales y se resolvieron en un período de 1-2 semanas. Tres pacientes de cada uno de los grupos de 1 y 5 mg/kg y uno del grupo de 20 ng/kg desarrollaron una infección del tracto urinario 1-2 meses después del tratamiento con CDP870. Un acontecimiento adverso, que era un episodio de dolor de cuello que se produjo tres días después de la infusión con 1 mg/kg, se consideró grave. Se observó un aumento de anticuerpos antinucleares en 4 pacientes: 1 en el grupo del placebo (negativo a 1/40), 2 en el grupo de 1 mg/kg (negativo a 1/40, negativo a 1/80) y 1 en el grupo de 20 mg/kg (negativo a 1/40). No se encontró ningún cambio en los anticuerpos anti-ADN o anti-cardiolipina.

Concentración de CDP870 en plasma y niveles de anti-CDP870

Como era de esperar, para todos los niveles de dosificación de CDP870, la concentración pico en plasma se alcanzó al final de la infusión y era proporcional a la dosis, reduciéndose posteriormente la concentración en plasma de forma lenta. El perfil de concentración en plasma de CDP870 parecía muy similar al observado previamente en voluntarios, en los que se calculó una vida media de aproximadamente 14 días. Tras la redosificación, se observó un perfil similar para la infusión de una sola dosis.

Después de una sola infusión intravenosa, los niveles de anti-CDP870 fueron bajos o indetectables.

Discusión

El TNFα neutralizador es una estrategia de tratamiento eficaz en RA. Actualmente, requiere el uso de agentes biológicos tales como un mAb quimérico o una proteína de fusión de receptor soluble/Fc humano, que son caros de fabricar. Un agente neutralizador de TNFα terapéutico necesita unirse a TNFα con alta afinidad y tener una alta vida media en plasma, baja antigenicidad y alta tolerancia y seguridad. También necesita ser accesible a todos los pacientes con RA que puedan aprovecharse del bloqueo de TNFα. Una tecnología que podría conseguir estos objetivos es la conjugación con polietilenglicol de un fragmento de anticuerpo de unión a TNFα obtenido en *E. coli*. En este

estudio preliminar, los presente solicitantes descubrieron que CDP870, un Fab modificado PEGilado, anti-TNFα, es eficaz y se tolera bien por los pacientes con RA.

Los estudios *in vitro* han demostrado que CDP870 tiene una actividad neutralizadora de TNFα similar al anticuerpo parental murino anti-TNFα. Este estudio confirma que CDP870 reducía la inflamación y mejoraba los síntomas en RA. La mejoría clínica medida por el criterio de respuesta ACR20 en los grupos de 5 y 20 mg/kg (75%, 75%) fue comparable a la del etanercept (60%) (Moreland y col., Annals Int. Med., 130, 478-486, 1999) e infliximab (50%) (Maini y col., Lancet, 354, 1932-1939, 1999). A los niveles de dosificación medio y máximo ensayados, el efecto terapéutico duró 8 semanas, que es comparable a otros mAb previos (Elliott y col., Lancet, 344, 1105-1110, 1994 y Rankin y col., Br. J. Rheumatol., 34, 334-342, 1995). El estudio previo ha demostrado que el efecto terapéutico del anticuerpo anti-TNFα está relacionado con su vida media en plasma y con la generación de anticuerpos circulantes (Maini y col., Arthritis Rheum, 38, (Supplement): S186 1995 (Abstract)). El estudio de los presentes solicitantes demostró que CDP870 tiene una vida media en plasma de 14 días, que es equivalente a la de un anticuerpo entero (Rankin y col., (*supra*)) y mucho mayor que la vida media de fragmentos Fab' no conjugados. Además, CDP870 generó niveles muy bajos de respuesta de anticuerpo.

Uno de los objetivos importantes de este estudio es examinar la tolerancia y seguridad de la administración de este Fab' PEGilado. En nuestro estudio, CDP870 parece tolerarse bien. Sin embargo, se necesitarán otros estudios para evaluar la toxicidad a largo plazo, especialmente el riesgo de enfermedad desmielinizante, infección y exantemas cutáneos que se han notificado con etanercept e infliximab.

En resumen, CDP870 es terapéuticamente eficaz en RA y se toleró bien en este estudio a corto plazo.

Debe entenderse que los ejemplos descritos anteriormente son simplemente ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia proporcionada como H1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 1) para CDRH1, como H2' en la Figura 3 (SEC ID NO: 2) o como H2' en la Figura 3 (SEC ID NO: 7) para CDRH2, o como H3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 3) para CDRH3.

2. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia proporcionada como L1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 6) para CDRL3.

3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 1 para CDRH1, en la SEC ID NO: 2 o en la SEC ID NO: 7 para CDRH2 o en la SEC ID NO: 3 para CDRH3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la

SEC ID NO: 4 para CDRL1, en la SEC ID NO: 5 para CDRL2 o en la SEC ID NO: 6 para CDRL3.

4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende la SEC ID NO: 1 para CDRH1, la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 7 para CDRH2, la SEC ID NO: 3 para CDRH3, la SEC ID NO: 4 para CDRL1, la SEC ID NO: 5 para CDRL2 y la SEC ID NO: 6 para CDRL3.

5. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la SEC ID NO: 2 para CDRH2.

6. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es una molécula de anticuerpo con CDR injertada.

7. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6, en la que el dominio variable comprende regiones estructurales aceptoras humanas y CDR donadoras no humanas.

8. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 7, en la que las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena pesada se basan en una secuencia consenso del grupo 1 humano y comprenden restos donadores no

humanos en las posiciones 28, 69 y 71.

9. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 7, en la que las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena pesada se basan en una secuencia consenso del grupo 1 humano y comprenden restos donadores no humanos en las posiciones 28, 38, 46, 67, 69 y 71.

10. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 7, en la que las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena pesada se basan en una secuencia consenso del grupo 3 humano y comprenden restos donadores no humanos en las posiciones 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 y 78.

11. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena ligera se basan en una secuencia consenso del grupo 1 humano y comprenden restos donadores no humanos en las posiciones 46 y 60.

12. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la región variable de la cadena ligera hTNF40-gL1 (SEC ID NO: 8) y la región

variable de la cadena pesada gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11).

13. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es un fragmento Fab.

14. La molécula de anticuerpo de las reivindicaciones 12 y 13, que es un fragmento Fab que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 111 y una cadena ligera que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113.

15. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es un fragmento Fab modificado que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o reportera.

16. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 15, en la que los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o dos restos de cisteína a los que puede unirse el efector o la molécula reportera.

17. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 12, que es un fragmento Fab modificado que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO:

115 y una cadena ligera que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113.

18. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113.

19. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113.

20. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115.

21. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena pesada que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115.

22. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115.

23. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115.

24. Una variante de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que tiene mejor afinidad por TNFα.

25. La variante de la reivindicación 24, que se obtiene por un protocolo de maduración de afinidad.

26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es el anticuerpo monoclonal murino anti-TNFα hTNF40.

27. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una molécula de anticuerpo quimérica que comprende los dominios variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 26.

28. Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, que tiene

unido covalentemente a un aminoácido en o hacia el extremo C-terminal de su cadena pesada una molécula efectora o reportera.

29. El compuesto de la reivindicación 28, que comprende una molécula efectora.

30. El compuesto de la reivindicación 29, en el que la molécula efectora comprende uno o más polímeros.

31. El compuesto de la reivindicación 30, en el que uno o más polímeros son un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado.

32. El compuesto de la reivindicación 31, en el que uno o más polímeros son un metoxipoli(etilenglicol).

33. Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de la reivindicación 17, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo cada grupo amino del resto de lisilo unido covalentemente un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de

aproximadamente 20.000 Da.

34. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína del extremo C-terminal de la cadena pesada uno o más polímeros sintéticos o naturales.

35. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada uno o más polímeros sintéticos o naturales.

36. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113, que tiene unido a uno de los restos de cisteína del extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo

amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli-(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

37. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113, que tiene unido a uno de los restos de cisteína del extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

38. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

39. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena pesada que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

40. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

41. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNFα humano, que tiene una cadena ligera que consta de la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que consta de la secuencia

proporcionada en la SEC ID NO: 115, que tiene unido a uno de los restos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, teniendo unido covalentemente cada grupo amino del resto de lisilo un resto de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

42. Una molécula de anticuerpo que comprende una CDR híbrida que comprende una secuencia de CDR donadora truncada, en la que la porción que falta de la CDR donadora se reemplaza por una secuencia diferente y forma una CDR funcional.

43. La molécula de anticuerpo en la reivindicación 42, en la que la parte que falta de la secuencia de CDR procede del anticuerpo del que proceden las regiones estructurales de la molécula de anticuerpo.

44. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 43, en la que la parte que falta de la secuencia de CDR procede de un anticuerpo de línea germinal que tiene regiones estructurales consenso.

45. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en la que CDRH2 de la cadena pesada

es híbrida en la molécula de anticuerpo.

46. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, en la que la truncación de la CDR donadora es de 1 a 8 aminoácidos.

47. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 46, en la que la truncación es de 4 a 6 aminoácidos.

48. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 47, en la que la truncación se realiza en el extremo C terminal de la CDR.

49. Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48.

50. La secuencia de ADN de la reivindicación 49, que comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 ó 10.

51. La secuencia de ADN de la reivindicación 49, que comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 10 ó 11.

52. La secuencia de ADN de la reivindicación 49, que comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 110, 112 ó

114.

53. Un vector de clonación o expresión que contiene la secuencia de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 52.

54. Un vector de expresión de *E. coli* que comprende la secuencia de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 52.

55. El vector de expresión de *E. coli* de la reivindicación 54 que es pTTO(CDP870).

56. Una célula huésped transformada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 55.

57. Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 56 y aislar la molécula de anticuerpo.

58. Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48, que comprende cultivar células *E. coli* que comprenden un vector de expresión de *E. coli* que comprende

la secuencia de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 55 y aislar la molécula de anticuerpo.

59. El procedimiento de la reivindicación 58, en el que la molécula de anticuerpo se dirige al periplasma.

60. Una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48 o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 41.

61. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48, que tiene especificidad por el TNFα humano, o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 41, para uso en el tratamiento de una patología mediada por TNFα.

62. La molécula de anticuerpo del compuesto de la reivindicación 61, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o de la osteoartritis.

63. Uso de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y 42 a 48, que tiene especificidad por el TNFα humano, o del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 41, en la fabricación

de un medicamento para el tratamiento de una patología mediada por TNFα.

64. El uso según la reivindicación 63, en el que la patología es la artritis reumatoide o la osteoartritis.

65. El vector pDNAbEng-G1 mostrado en la Figura 19.

66. El vector pTTO(CDP870) mostrado en la Figura 22.

67. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 7.

1/27

FIG. 1

COMPARACIONES DE REGIONES ESTRUCTURALES DE CADENA LIGERA DE ANTICUERPO htnf40 Y SECUENCIAS CONSENSO HUMANAS DEL GRUPO 1

consenso Hu grupo 1	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 83)
hTNF40	:	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEC ID NO: 84)
consenso Hu grupo 1	:	WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 85)
hTNF40	:	WYQQKPGQSPKALIY (SEC ID NO: 86)
Consenso Hu grupo 1	:	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 87)
hTNF40	:	GVPYRFTGSGSGTDFTLTISTVQSEDLAEYFC (SEC ID NO: 88)
consenso Hu grupo 1	:	FGQGTKVEIKR (SEC ID NO: 89)
hTNF40	:	FGAGTKLELKR (SEC ID NO: 90)

FIG. 3 Secuencia de CDR de hTNF40

H1 DYGMN (SEC ID NO:1)

H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (SEC ID NO:7)

H2'WINTYIGEPIYADSVKG (SEC ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEC ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEC ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEC ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEC ID NO:6)

2/27

FIG. 2

Comparaciones de regiones estructurales de cadena pesada del anticuerpo hTNF40 y secuencias consenso humanas del grupo 1 y del grupo 3

consenso Hu grupo 1 : QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEC ID NO: 91)
hTNF40 : QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (SEC ID NO: 92)

consenso Hu grupo 1 : WVRQAPGQGLEWMG (SEC ID NO: 93)
hTNF40 : WVKQAPGKAFKWMG (SEC ID NO: 94)

consenso Hu grupo 1 :RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEC ID NO: 95)
hTNF40 :RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR (SEC ID NO: 96)

consenso Hu grupo 1 : WGQGTLVTVSS (SEC ID NO: 97)
hTNF40 : WGQGTLTVSS (SEC ID NO: 98)

consenso Hu grupo 3 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEC ID NO: 106)
hTNF40 : QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (SEC ID NO: 92)

consenso Hu grupo 3 : WVRQAPGKGLEWVS (SEC ID NO: 107)
hTNF40 : WVKQAPGKAFKWMG (SEC ID NO: 94)

consenso Hu grupo 3 :RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEC ID NO: 108)
hTNF40 :RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR (SEC ID NO: 96)

consenso Hu grupo 3 : WGQGTLVTVSS (SEC ID NO: 109)
hTNF40 : WGQGTLTVSS (SEC ID NO: 98)

3/27

FIG. 4

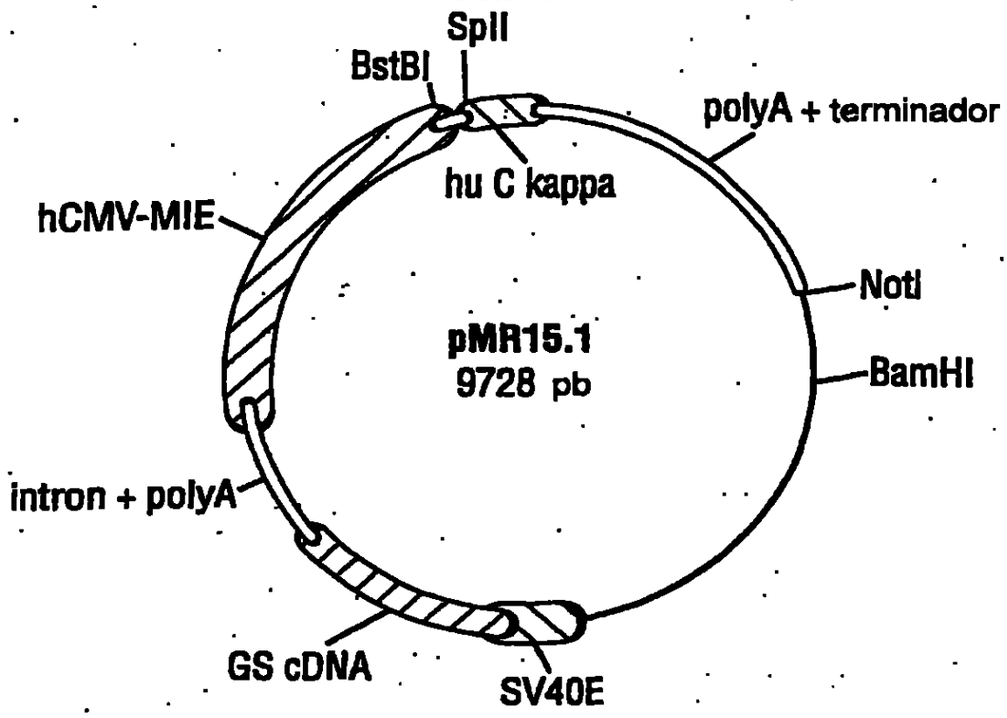


FIG. 5

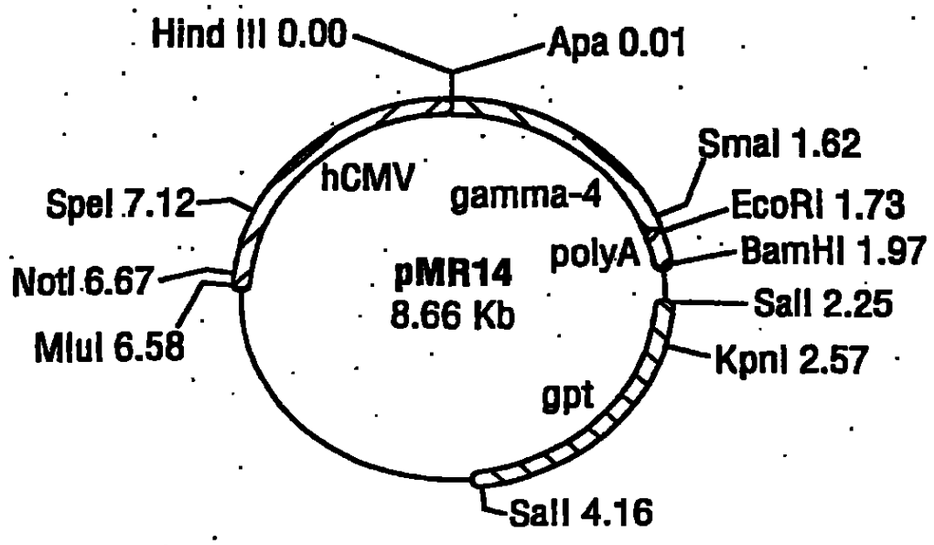


FIG. 6 Secuencia Murina VI de hTNF40 (SEC ID NO: 99)

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

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

110                 120                 130                 140                 150                 160
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA
GTT GTC TTT GGT CCT GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT
 Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   F   L>

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

  220                 230                 240                 250                 260                 270
CTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA
GAG TGG TAG TCG TGA CAC GTC AGA CTT CTG AAC CGT CTC ATA AAG ACA GTC GTT
 L   T   I   S   T   V   Q   S   E   D   L   A   E   Y   F   C   Q   Q>

          280                 290                 300                 310                 320
TAT AAC ATC TAT CCT CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT
ATA TTG TAG ATA GGA GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CTC GAC TTT GCA
 Y   N   I   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>
```

4127 106

FIG. 7 Secuencia Murina Vh de hTNF40 (SEC ID NO: 100)

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

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

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

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

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

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

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


527

FIG. 8 Secuencia Injertada VI de hTNF40 (SEC ID NO: 8)

```
                10                  20                  30                  40                  50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

    60                  70                  80                  90                 100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
 V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

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

FIG. 9 Secuencia Injertada VI de hTNF40 (SEC ID NO: 9)

```
          10          20          30          40          50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

     60          70          80          90          100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
 V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

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

FIG. 10 Secuencia injertada Vh de hTNF40 (SEC ID NO: 10)

```
     10          20          30          40          50
CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GCT TCC GTC
GTC CAC GTC GAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA CGA AGG CAG
 Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S   V>

     60          70          80          90          100
AAA GTT TCG TGT AAG GCC TCA GGC TAC GTG TTC ACA GAC TAT GGT ATG AAT TGG
TTT CAA AGC ACA TTC CGG AGT CCG ATG CAC AAG TGT CTG ATA CCA TAC TTA ACC
 K   V   S   C   K   A   S   G   Y   V   F   T   D   Y   G   M   N   W>

110          120         130         140         150         160
GTC AGA CAG GCC CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
CAG TCT GTC CGG GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA 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>
```

827

110

FIG. 11 Secuencia injertada Vh de hTNF40.4 (SEC ID NO: 11)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 12

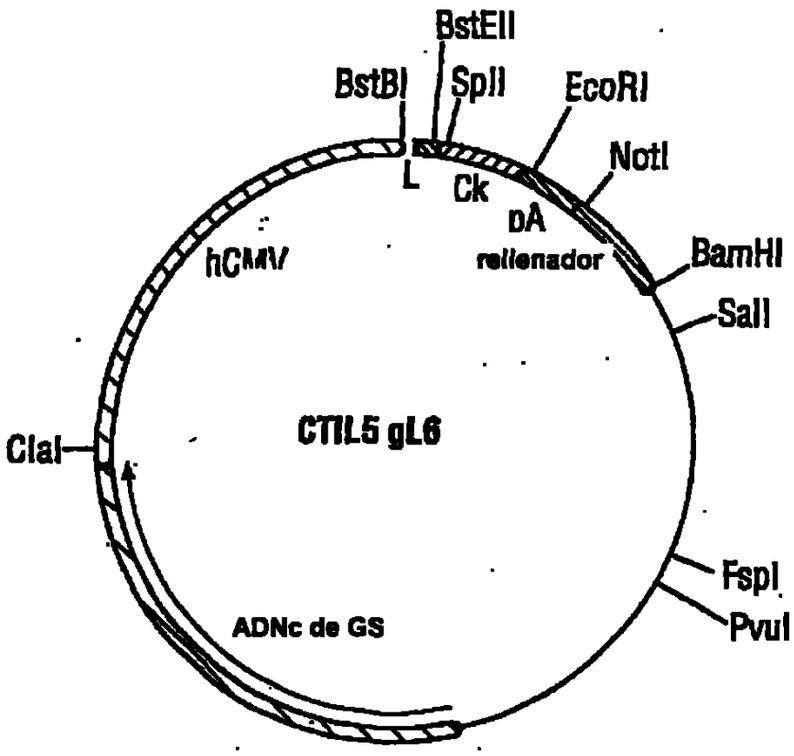
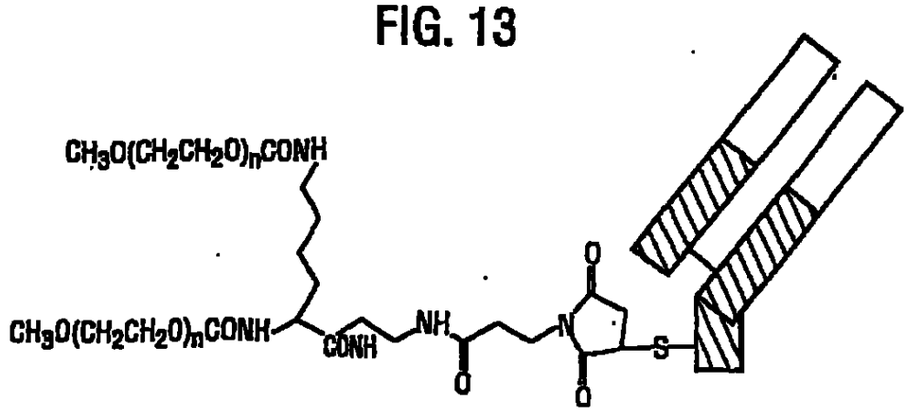

BstEII
BstBI
SpII
EcoRI
NotI
L
Ck
pA
hCMV
rellenador
BamHI
SalI
ClaI
CTIL5 gL6
FspI
PvuI
ADNc de GS

FIG. 13


CH3O(CH2CH2O)nCONH
CH3O(CH2CH2O)nCONH
CONH
NH
O
O
N
O
S

11/27

FIG. 14

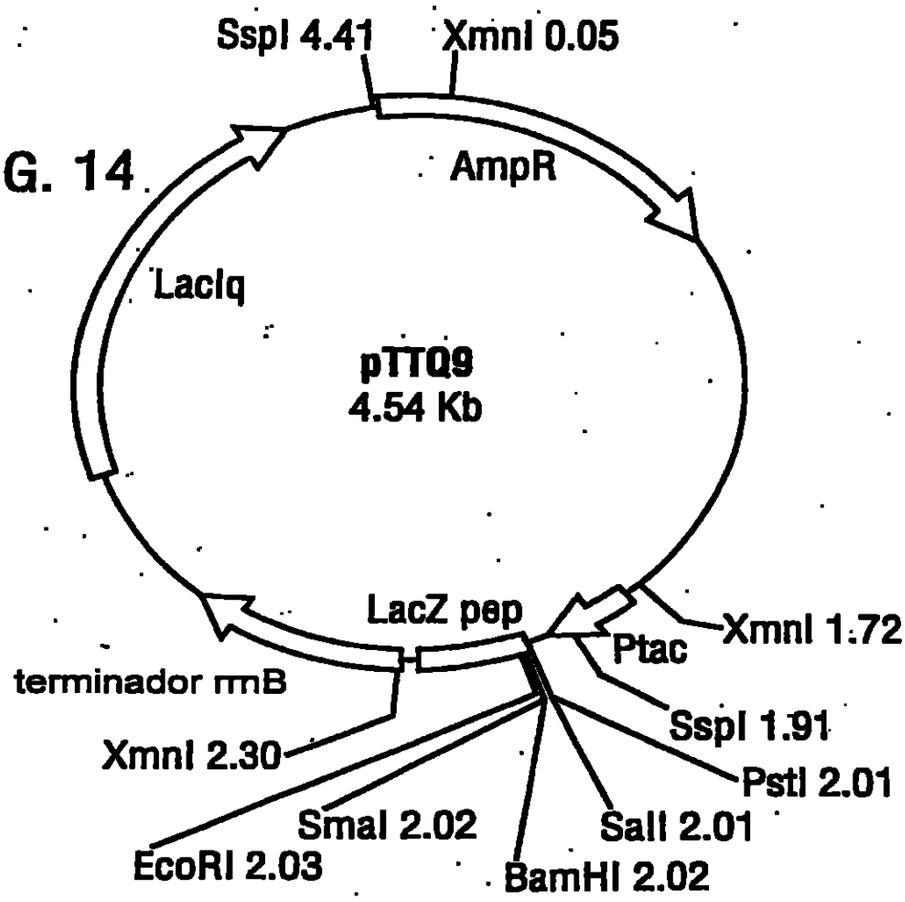


FIG. 16

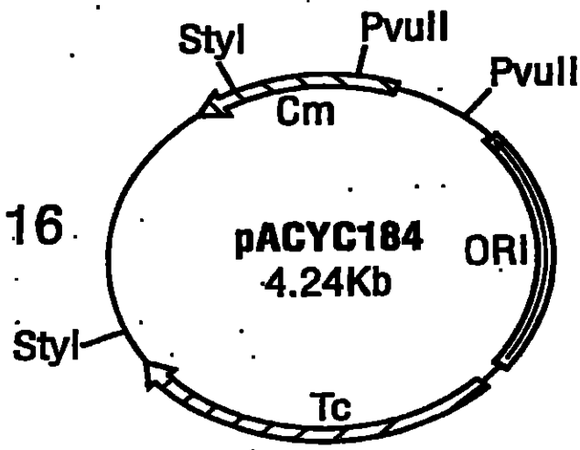
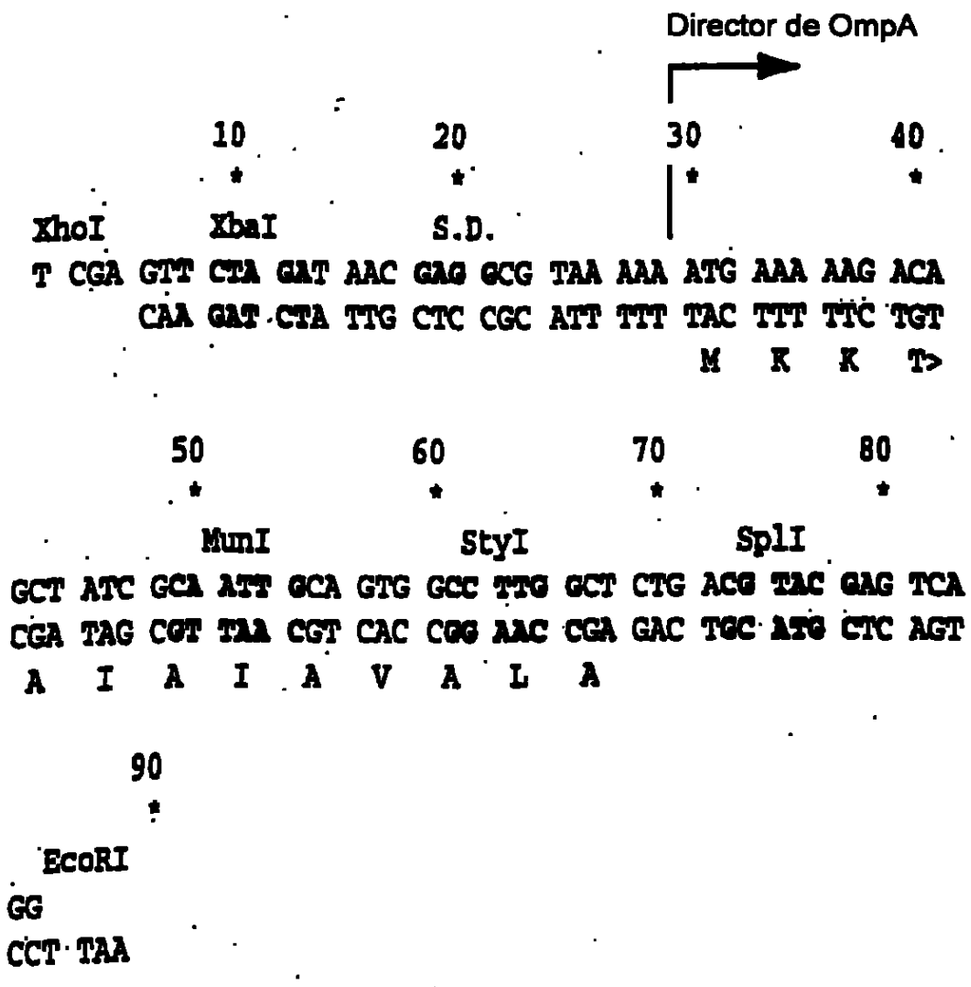


FIG. 15

Secuencia del adaptador oligonucleotídico OmpA (SEC ID NO: 101)



- Los sitios de restricción internos se muestran en negrita
- Los extremos cohesivos 5'XhoI se unen al sitio SalI del vector, bloqueándolo
- S.D. representa la secuencia de Shine Dalgarno OmpA

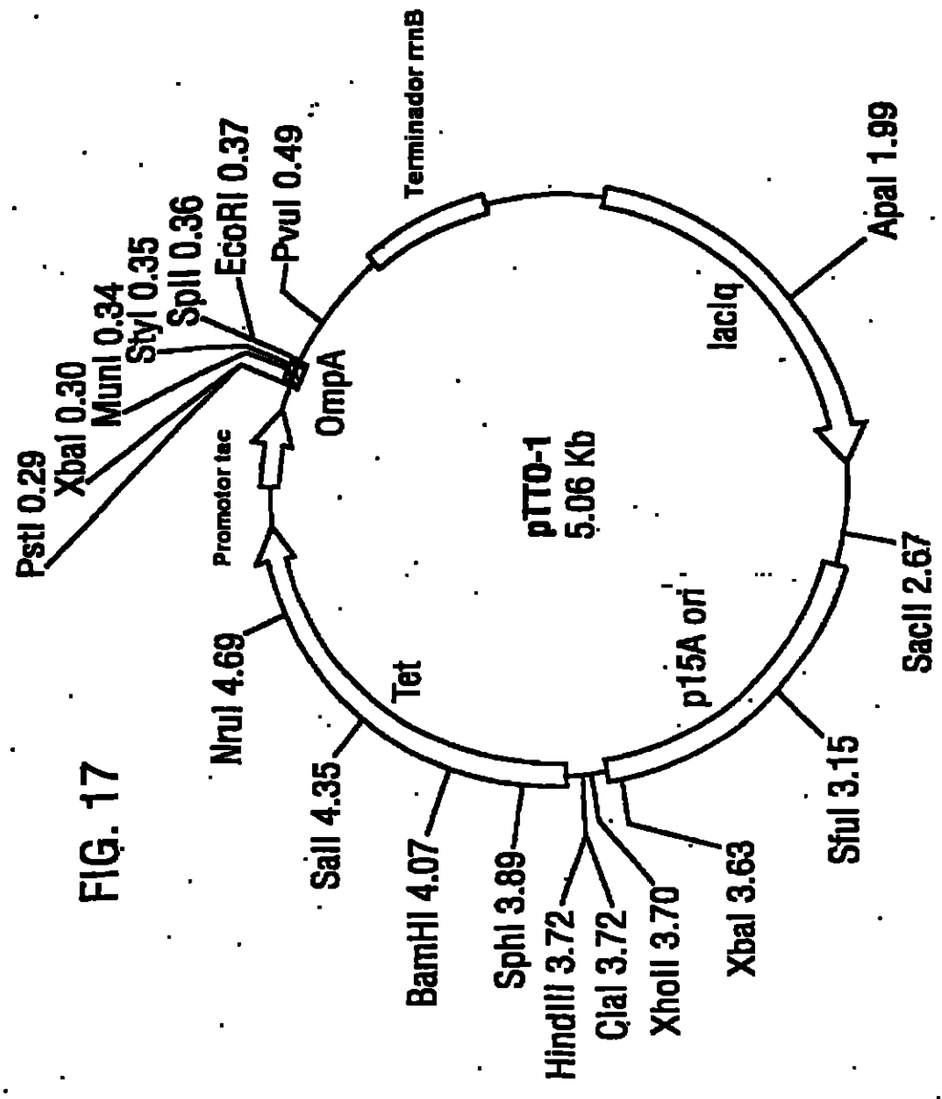

pTTO-1
5.06 Kb
Terminador rrnB
ApaI 1.99
lacIq
SacII 2.67
SfuI 3.15
XbaI 3.63
XhoII 3.70
ClaI 3.72
HindIII 3.72
SphI 3.89
BamHI 4.07
SalI 4.35
Tet
NruI 4.69
Promotor tac
OmpA
PstI 0.29
XbaI 0.30
MunI 0.34
StyI 0.35
SpII 0.36
EcoRI 0.37
PvuI 0.49
p15A ori

FIG. 17

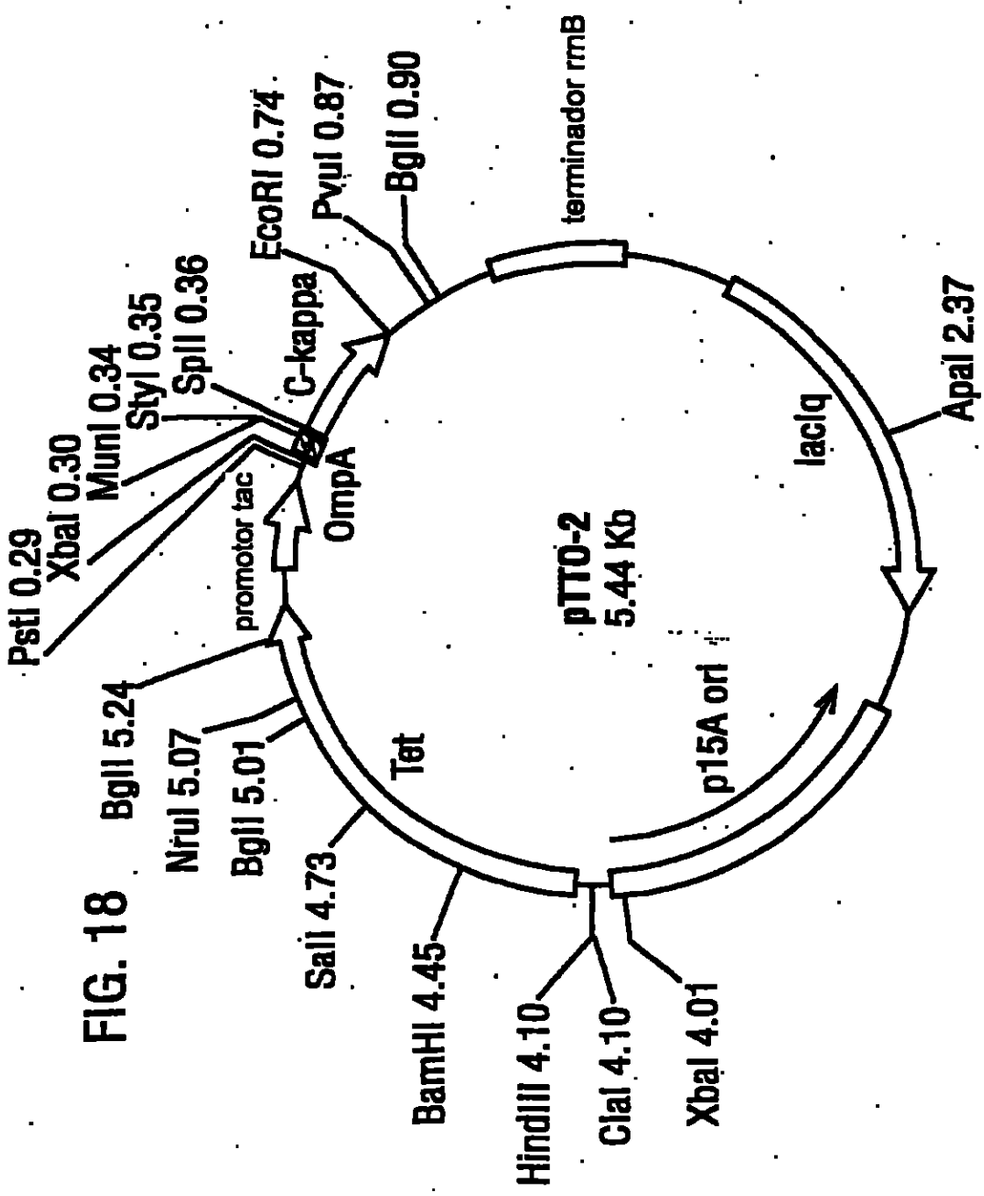

pTT0-2
5.44 Kb
terminador rmB
EcoRI 0.74
PvuI 0.87
BglI 0.90
C-kappa
SpII 0.36
StyI 0.35
MunI 0.34
XbaI 0.30
PstI 0.29
promotor tac
OmpA
lacIq
ApaI 2.37
BglI 5.24
NruI 5.07
BglI 5.01
Tet
SalI 4.73
BamHI 4.45
HindIII 4.10
ClaI 4.10
XbaI 4.01
p15A ori

FIG. 18

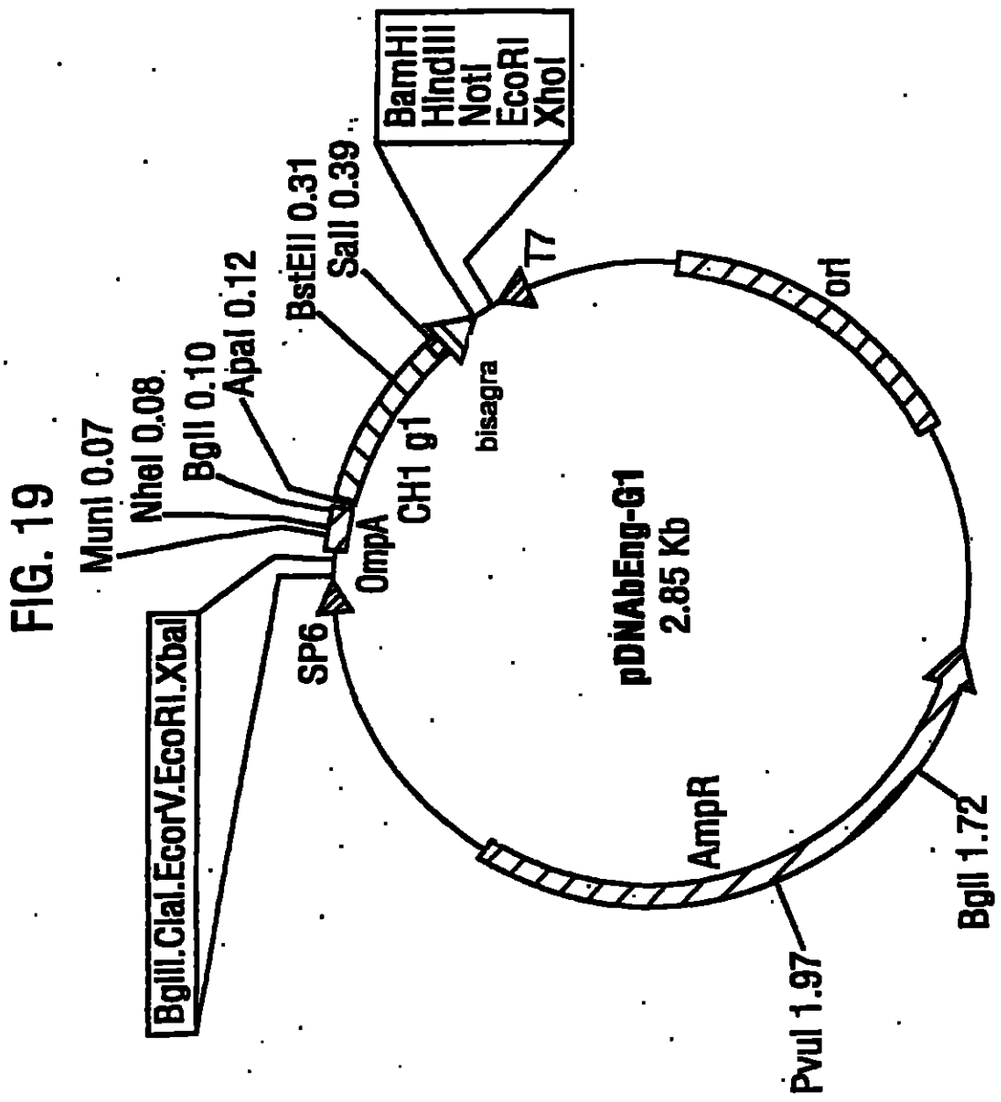

BamHI
HindIII
NotI
EcoRI
XhoI
SalI 0.39
BstEII 0.31
ApaI 0.12
BglI 0.10
NheI 0.08
MunI 0.07
BglII.ClaI.EcorV.EcoRI.XbaI
SP6
OmpA
CH1 g1
bisagra
T7
ori
pDNAbEng-G1
2.85 Kb
AmpR
PvuI 1.97
BglI 1.72

FIG. 19

FIG. 20 CASSETTES DE OLIGONUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN DIFERENTES SECUENCIAS INTERGÉNICAS PARA LA EXPRESIÓN DE Fab' en E. Coli

CASSETTE IGS-1 ; Espacio intergénico = -1

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

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

Final de la secuencia c-kappa -> Inicio de la secuencia OmpA ->

CASSETTE IGS-2 ; Espacio intergénico = +1

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

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

CASSETTE IGS-3 ; Espacio intergénico = +13

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

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

CASSETTE IGS-4 ; Espacio intergénico = +13

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

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

16/27

118

1

IGS1
IGS2
IGS3
IGS4
ORIGINAL
Acumulación periplásmica de Fab' - Variantes IGS
ng/ml/OD
400
300
200
100
0
TIEMPO (HORAS DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN)
0
1
2
3
4
5

FIG. 21

FIG. 22

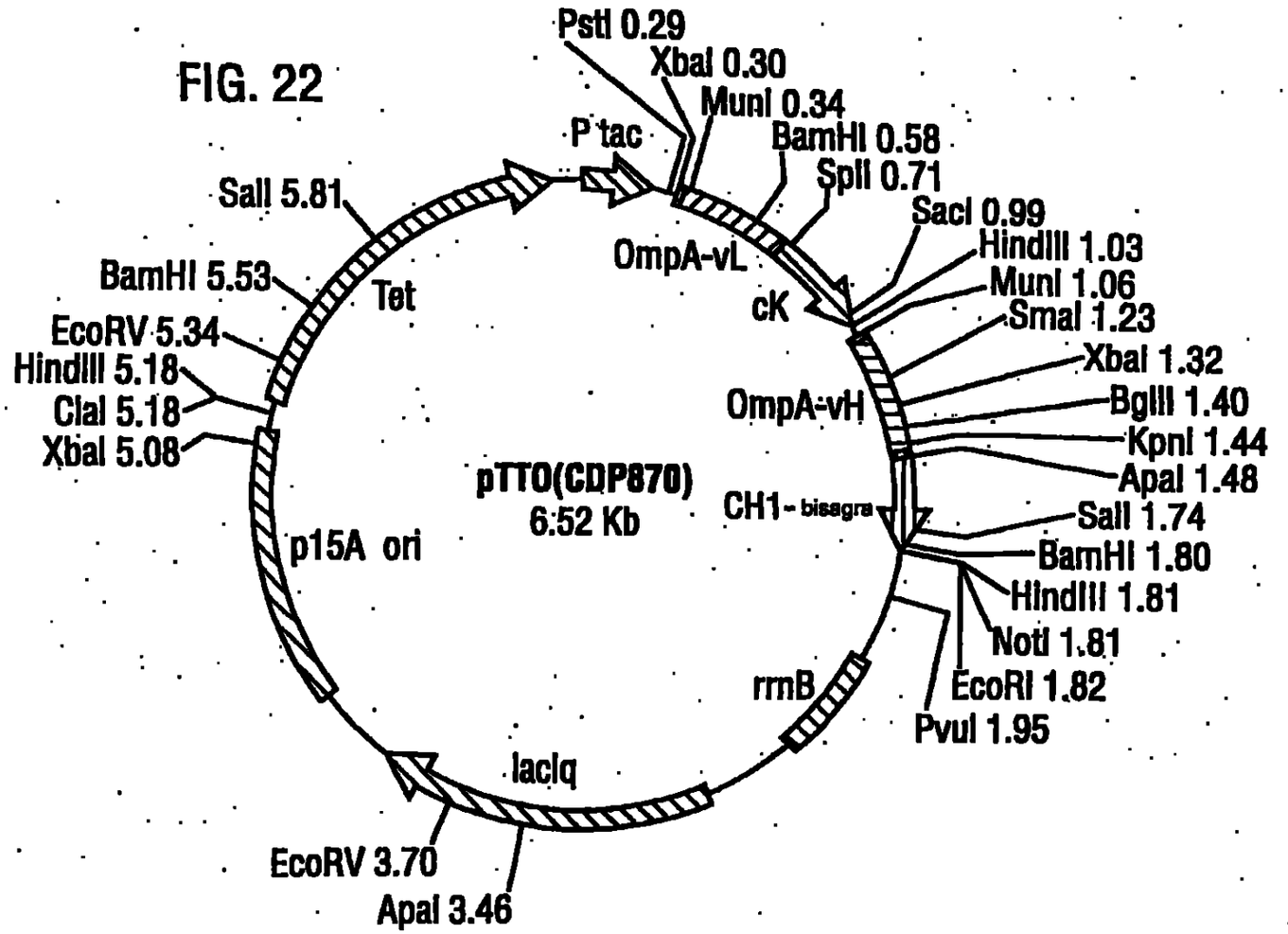
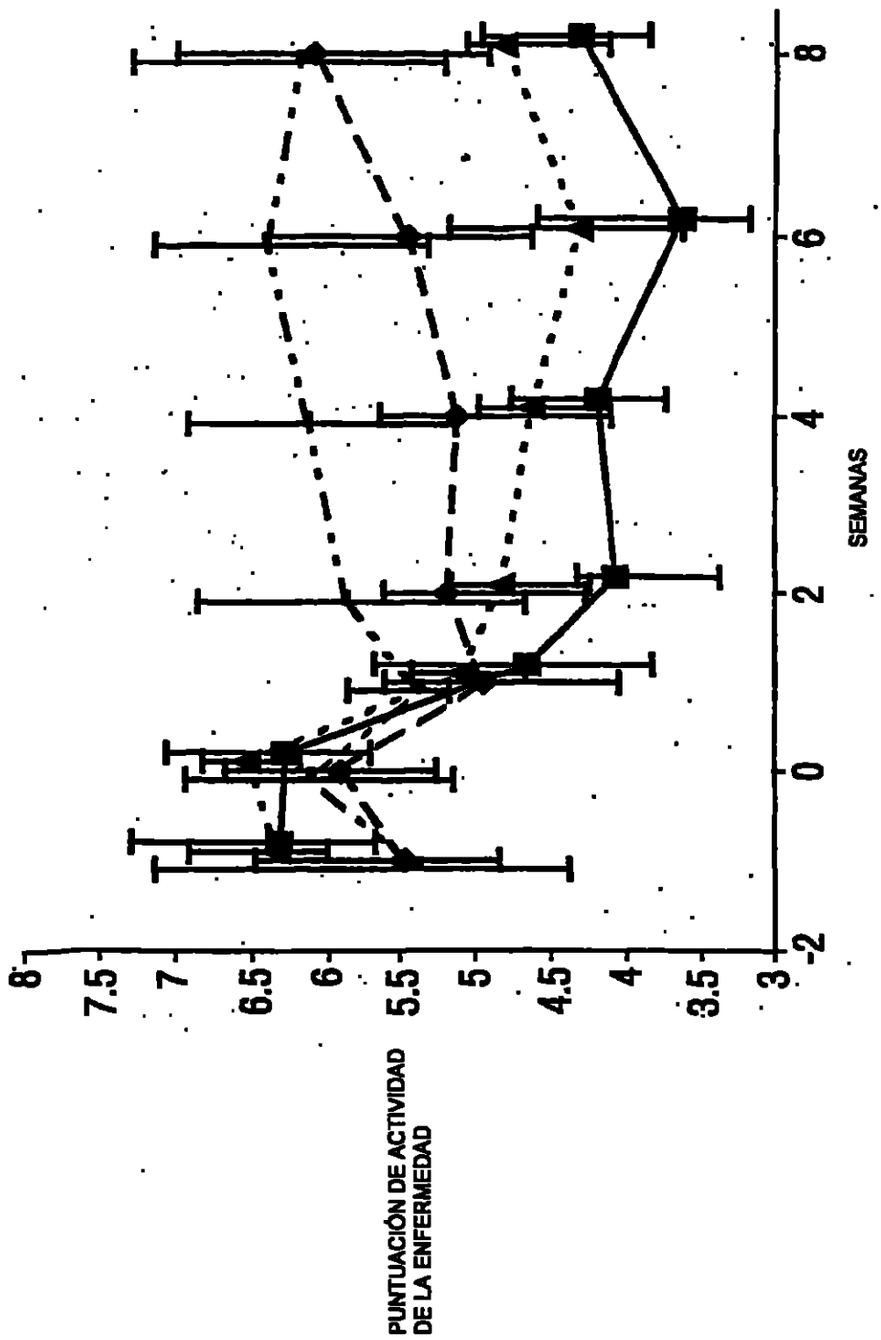

PstI 0.29
XbaI 0.30
MunI 0.34
BamHI 0.58
SpII 0.71
SacI 0.99
HindIII 1.03
MunI 1.06
SmaI 1.23
XbaI 1.32
BglII 1.40
KpnI 1.44
ApaI 1.48
SalI 1.74
BamHI 1.80
HindIII 1.81
NotI 1.81
EcoRI 1.82
PvuI 1.95
rrnB
lacIq
EcoRV 3.70
ApaI 3.46
p15A ori
SalI 5.81
BamHI 5.53
EcoRV 5.34
HindIII 5.18
ClaI 5.18
XbaI 5.08
Tet
P tac
OmpA-vL
cK
OmpA-vH
CH1-bisagra
pTTO(CDP870)
6.52 Kb

FIG. 23


PUNTUACIÓN DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD
8
7.5
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
3.5
3
-2
0
2
4
6
8
SEMANAS

125

FIG. 24

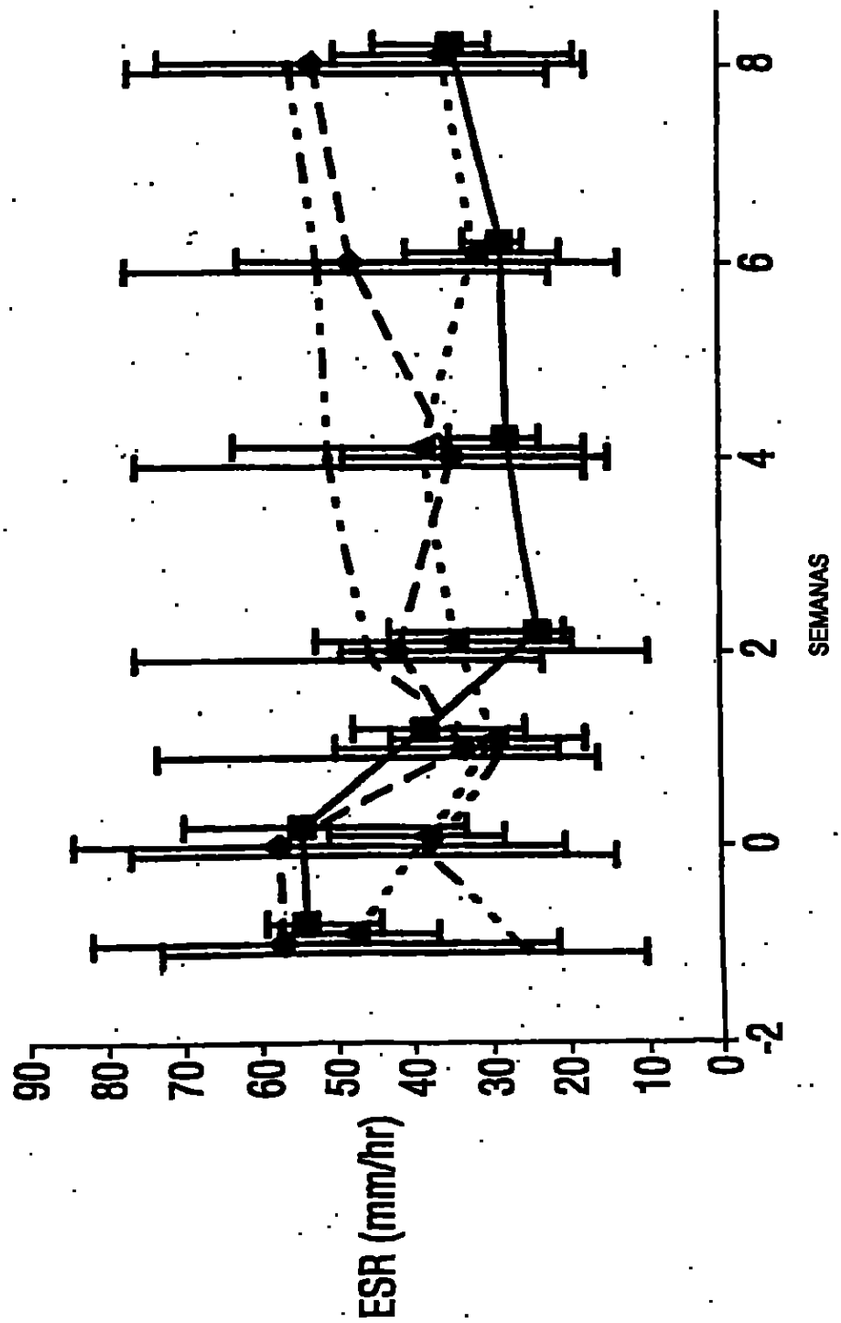


FIG. 24 (Continuación)

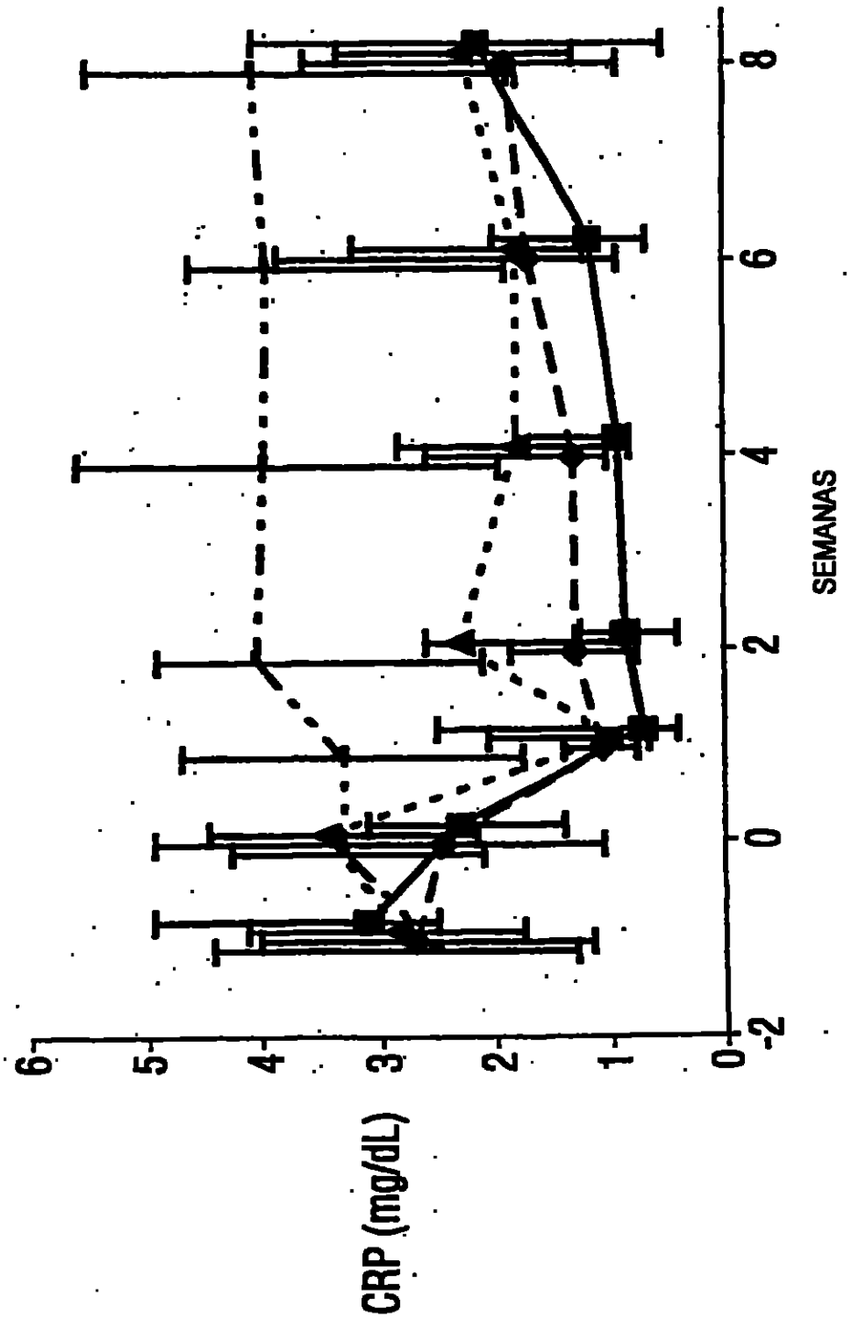


FIG. 24 (Continuación)

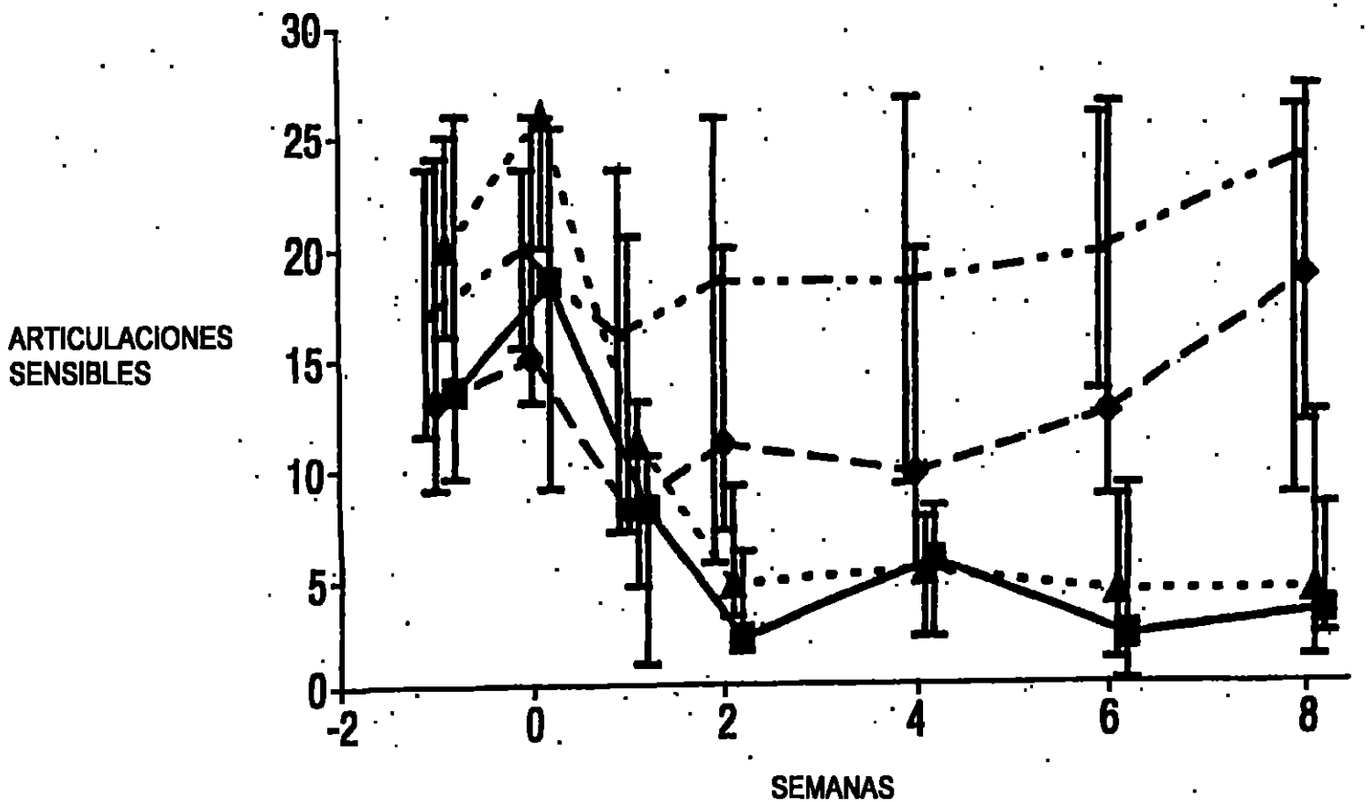


FIG. 24 (Continuación)

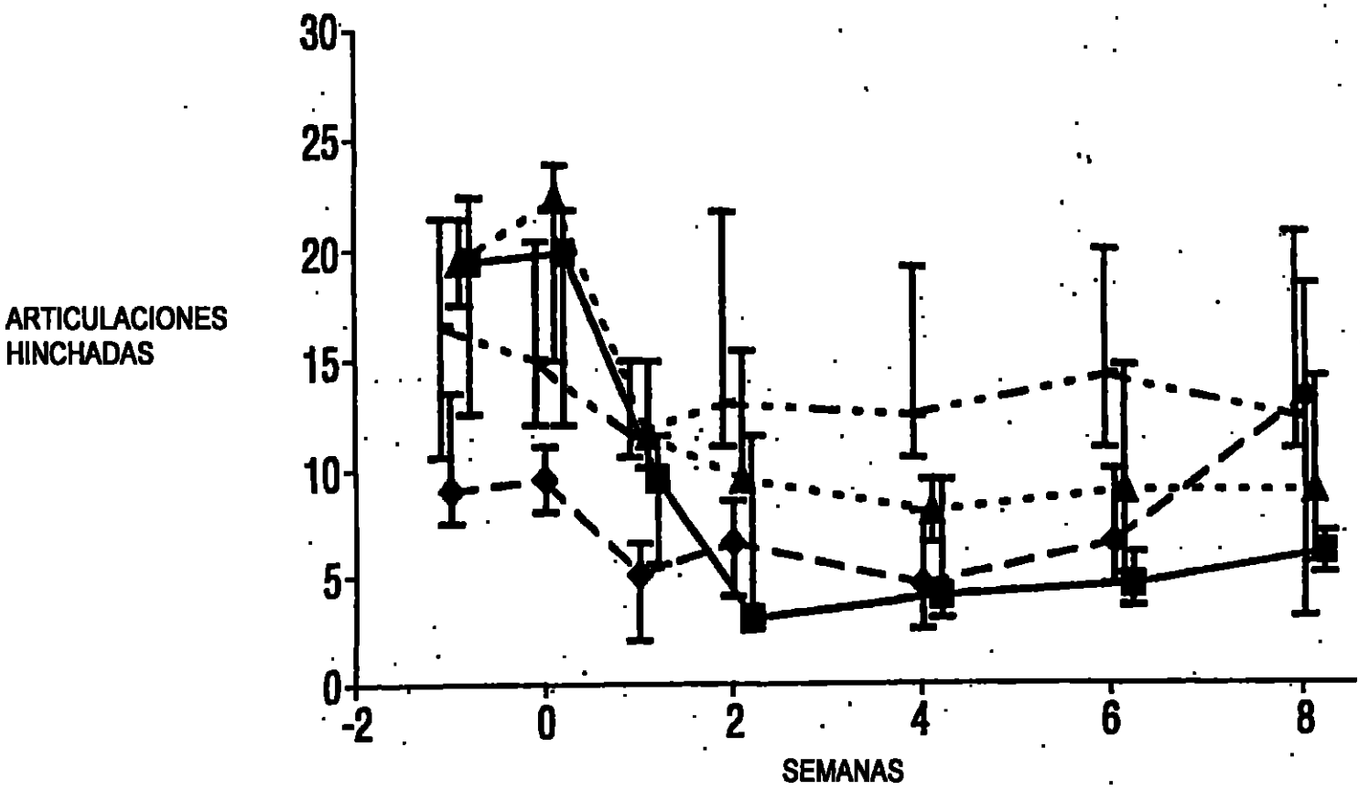


FIG. 24 (Continuación)

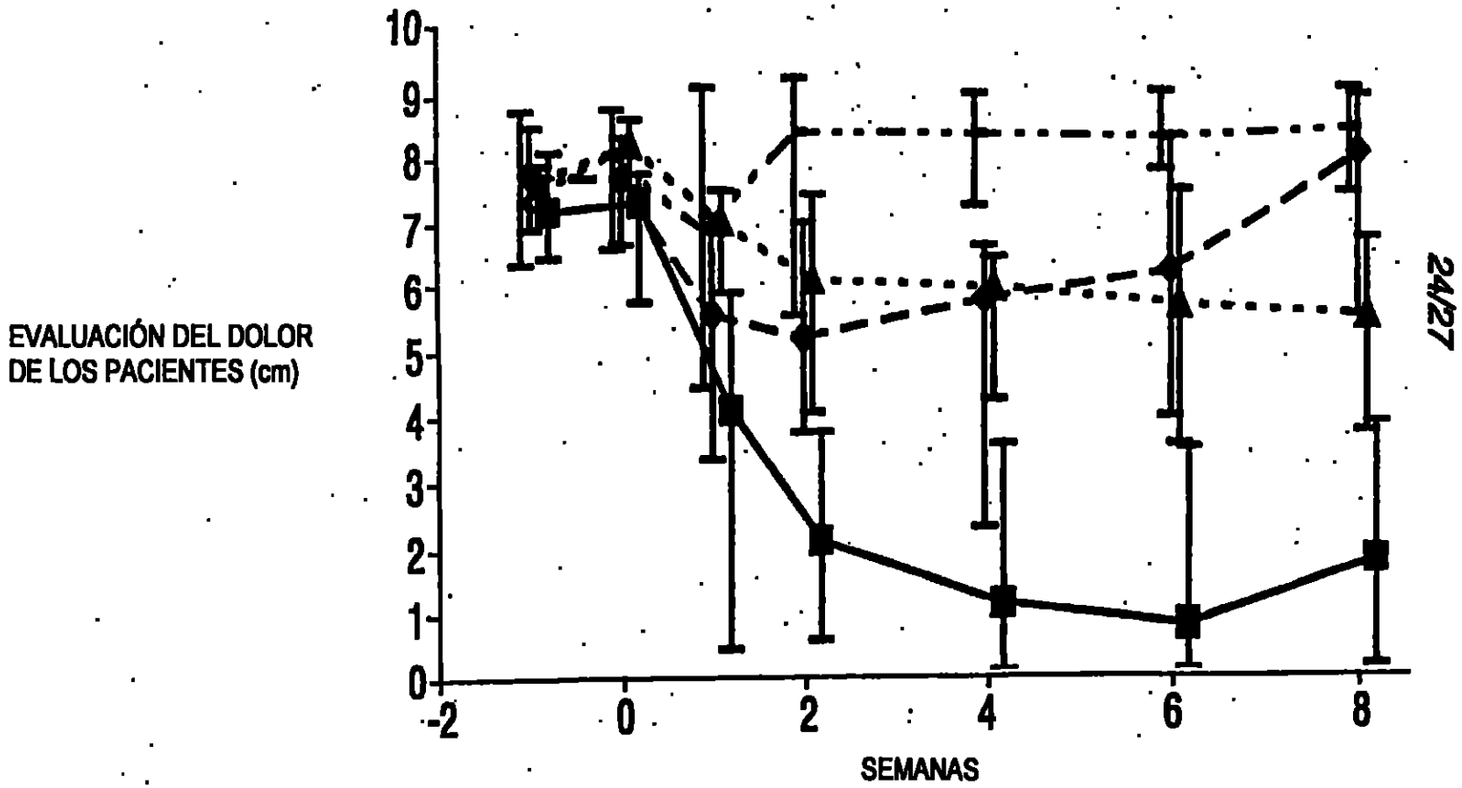


FIG. 24 (Continuación)

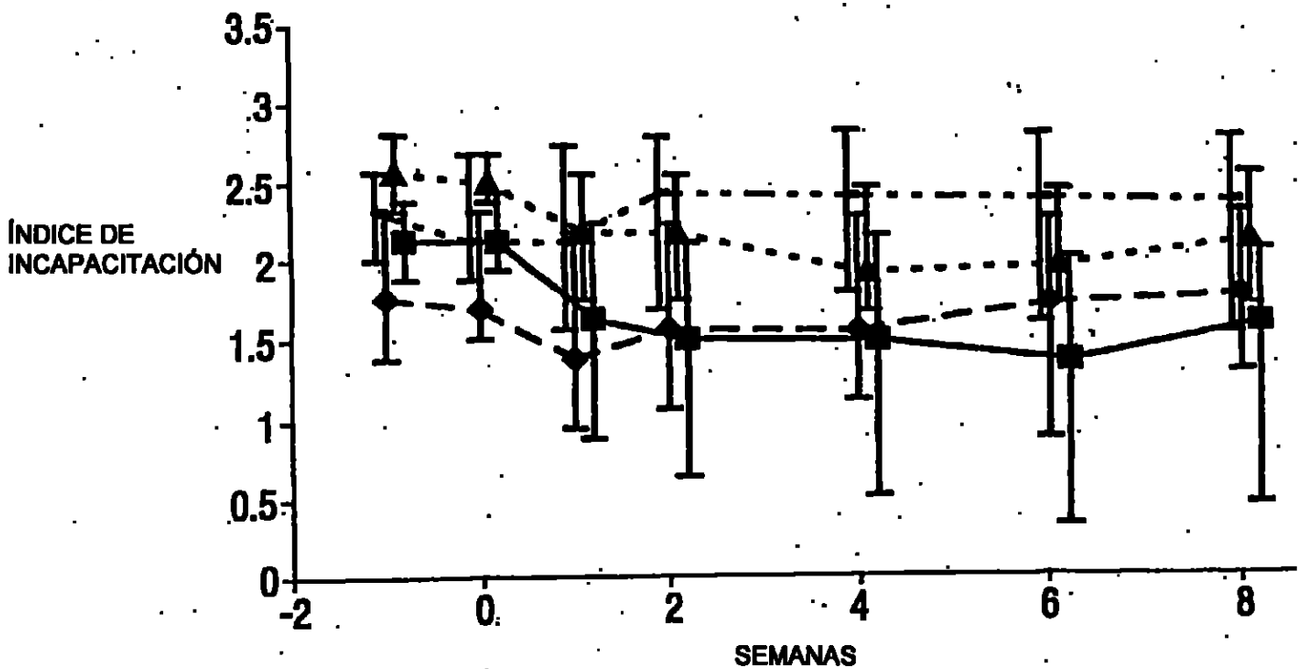


FIG. 24 (Continuación)

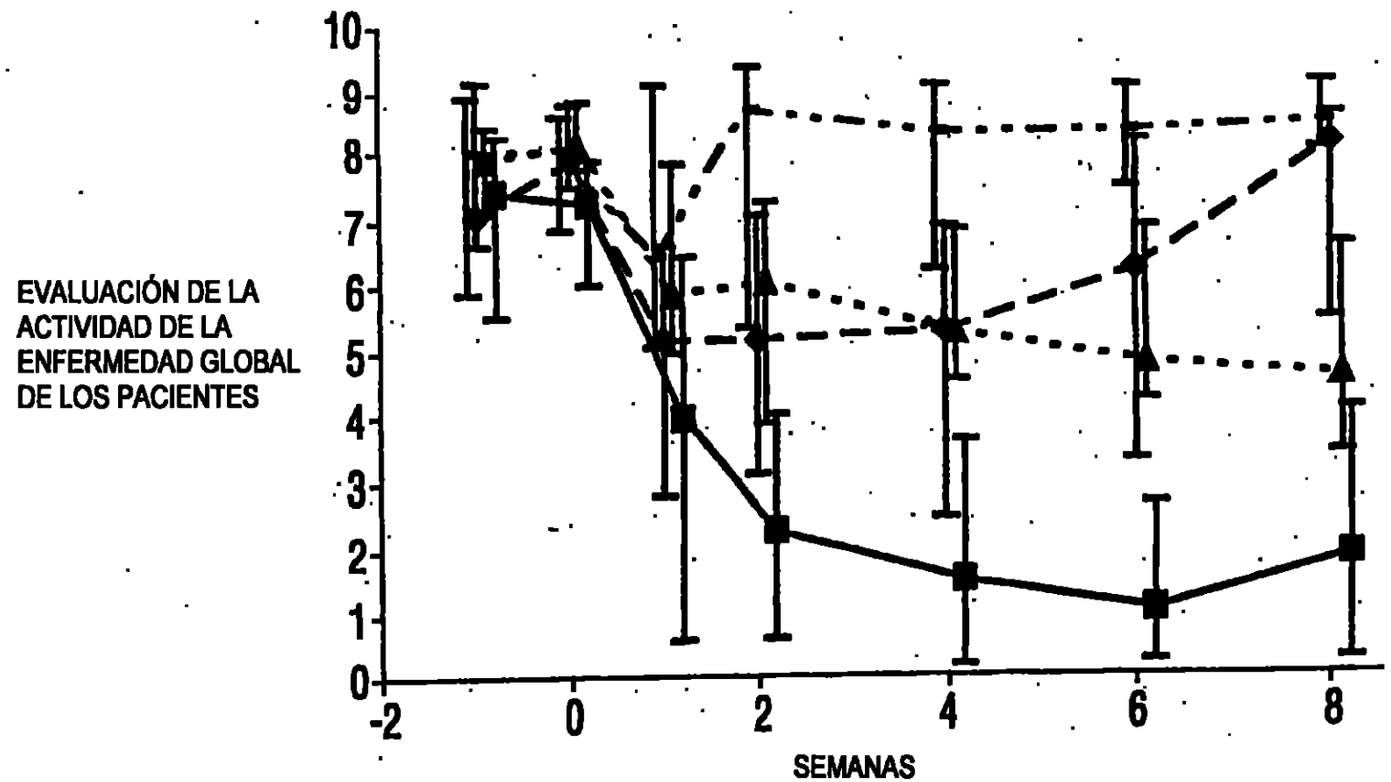
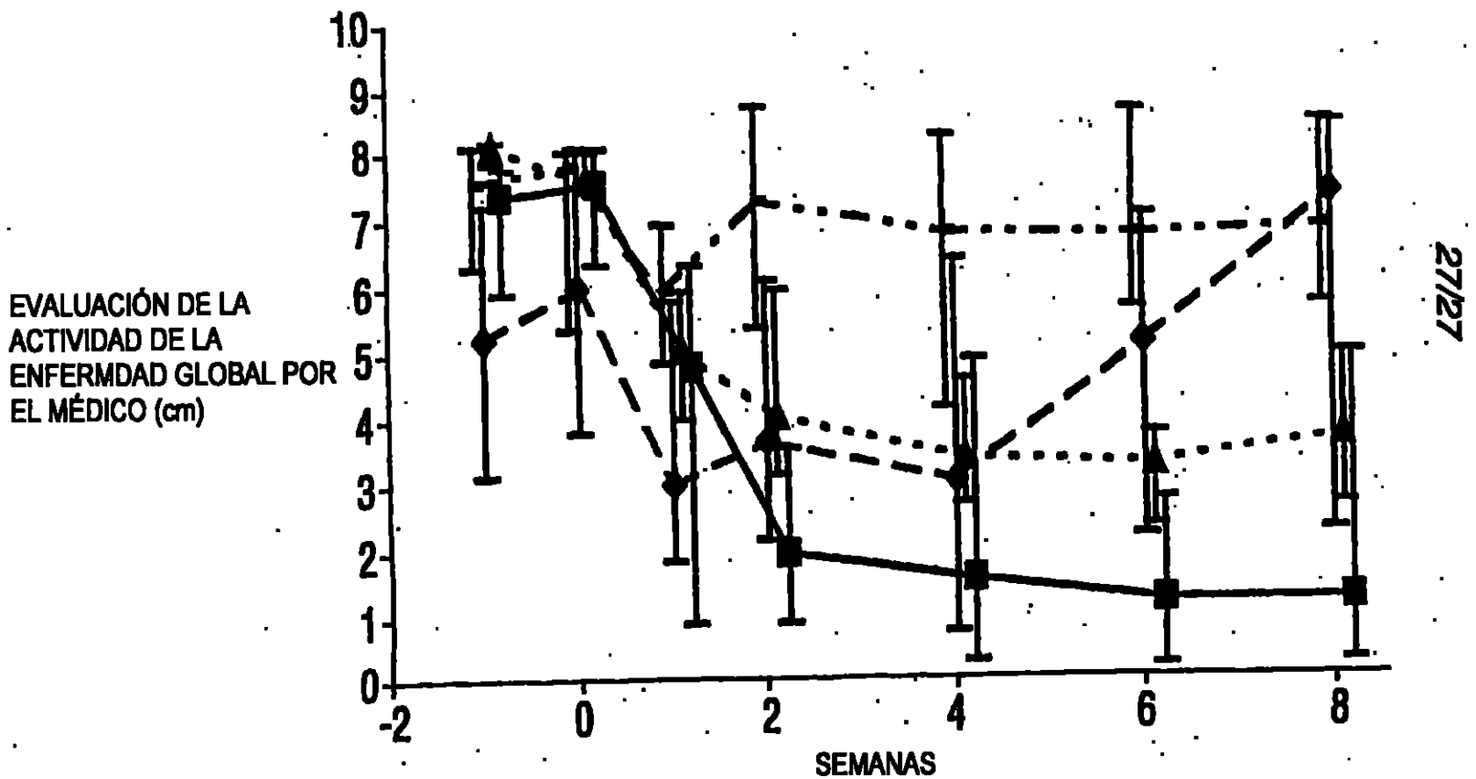


FIG. 24 (Continuación)



LISTA DE SECUENCIAS

<110> CELLTECH CHIROSCIENCE LIMITED

<120> PRODUCTOS BIOLÓGICOS

<130> PO21741WO

<140>

<141>

<160> 115

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40 CDRH1

<400> 1

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:

hTNF40/CDRH2 hibrida humana

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40 CDRH3

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40 CDRL2

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40 CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40 CDRH2

<400> 7

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

<210> 8

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 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 ctg 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

acg 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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: gh1hTNF40.4 (Figura 10)

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

cta gtc acg gtc tcc tca                                          354
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 11

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: gh3hTNF40.4 (Figura 11)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: parte de una secuencia de cebador

<400> 12

gccgccacc 9

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH1

<400> 13

atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

<210> 14

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH2

<400> 14

atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH3

<400> 15

atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt 26

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH4

<400> 16

atgractttg ggytcagctt grt 23

<210> 17

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH5

<400> 17

atggactcca ggctcaattt agtttt 26

<210> 18

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH6

<400> 18

atggctgtcy trgagctrct cttctg 26

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH7

<400> 19

atggratgga gckggrtctt tmtctt 25

<210> 20

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH8

<400> 20

atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 21

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH9

<400> 21

atggwttggg tgtggamctt gctatt 26

<210> 22

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH10

<400> 22

atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH11

<400> 23

atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CH12

<400> 24

atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: extremo 5' del cebador

<400> 25

gcgcgcaagc ttgccgccac c 21

<210> 26

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL1

<400> 26

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct 29

<210> 27

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL2

<400> 27

atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL3

<400> 28

atgagtgtgc tcactcaggt cct 23

<210> 29

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL4

<400> 29

atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 30

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL5

<400> 30

atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

<210> 31

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL5A

<400> 31

atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

<210> 32

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL6

<400> 32

atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL7

<400> 33

atgggcwtca agatggagtc aca 23

<210> 34

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL8

<400> 34

atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL9

<400> 35

atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 36

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL10

<400> 36

atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

<210> 37

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL11

<400> 37

atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 38

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL12A

<400> 38

atgragtywc agacccaggt cttyrt 26

<210> 39

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL12B

<400> 39

atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 40

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL13

<400> 40

atggattcac aggcccaggt tcttat 26

<210> 41

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL14

<400> 41

atgatgagtc ctgcccagtt cctgtt 26

<210> 42

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL15

<400> 42

atgaatttgc ctgttcatct cttggtgct 29

<210> 43

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL16

<400> 43

atggattttc aattggtcct catctcctt 29

<210> 44

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL17A

<400> 44

atgaggtgcc tarctaagtt cctgrg 26

<210> 45
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL17B
<400> 45
atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

<210> 46
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL17C
<400> 46
atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

<210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: extremo 5' del cebador

<400> 47

ggactgttcg aagccgccac c 21

<210> 48

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador CL12

<400> 48

ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt 30

<210> 49

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador R2155

<400> 49

gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrgag acdgtga 37

<210> 50

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador R1053

<400> 50

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 51

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador R720

<400> 51

gctctcggag gtgctcct 18

<210> 52

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7982

<400> 52

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg tatcagcaaa 60 70

<210> 53

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7983

<400> 53

atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctggtt tttgctgata ccaggctacg t 60 71

<210> 54

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7984

<400> 54

tacagtgcct ctttcctcta tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggt 60
actgatttca c 71

<210> 55

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7985

<400> 55

gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60
taccactacc g 71

<210> 56

<211> 89

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7986

<400> 56

atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggta 60
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

<210> 57

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7981

<400> 57

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido P7980

<400> 58

gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

<210> 59

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido R1053

<400> 59

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido R5350

<400> 60

tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido R5349

<400> 61

gcagatggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido R684

<400> 62

ttcaactgct catcagat 18

<210> 63

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7989

<400> 63

gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60
aattc 65

<210> 64

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7990

<400> 64

ggttaagaag cctggtgctt ccgtcaaagt ttcgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60
agactatggt a 71

<210> 65

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7991

<400> 65

ccaacccatc catttcaggc cttgtcccgg ggcctgcttg acccaattca taccatagtc 60
tgtgaacacg t 71

<210> 66

<211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7995

<400> 66

ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcaacgt c 81

<210> 67

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7992

<400> 67

ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7993

<400> 68

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 69

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7994

<400> 69

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7988

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7987

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

<210> 72

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7999

<400> 72

gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg aattc 60 65

<210> 73

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P8000

<400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtcctgtgct gcatctggtt acgtcttcac 60
agactatgga a 71

<210> 74

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P8001

<400> 74

ccaacccatc catttcaggc cctttcccgg ggcctgctta accaaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7997

<400> 75

ggaggtatgc tgttgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7998

<400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact at 60 62

<210> 77

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7993

<400> 77

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata gtacactgcg gtgtcctc 60 78

<210> 78

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P7996

<400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

<210> 79

<211> 74

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador 5'

<400> 79

cgcgaggcaa ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60
atgacccaga gccc 74

<210> 80

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador 3'

<400> 80

ttcaactgct catcagatgg 20

<210> 81

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador 5'

<400> 81

gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttcgccaccg tggcgcaagc tgaggttcag 60
ctggtcgagt caggaggc 78

<210> 82

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador 3'

<400> 82

gcctgagttc cacgacac 18

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura

consenso L1 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura L1 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso L2 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura L2 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso L3 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura L3 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura

consenso L4 del grupo humano 1

<400> 89

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

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura L4 de hTNF40

<400> 90

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

<210> 91

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H1 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura H1 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H2 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura H2 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H3 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura H3 de hTNF40

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H4 del grupo humano 1

<400> 97

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

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura H4 de hTNF40

<400> 98

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

<210> 99

<211> 324

<212> ADN

<213> murino

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> dominio variable de la cadena ligera de hTNF40 de ratón

<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> ADN

<213> murino

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223> dominio variable de la cadena pesada de hTNF40 de ratón

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 101

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (29)..(67)

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: adaptador del oligonucleótido OmpA

<400> 101

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

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

<210> 102

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(40)

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(66)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cassette IGS-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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (45)..(68)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cassette IGS-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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cassette IGS-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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cassette IGS-4

<400> 105

```
g agc tca cca gta acg 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H1 del grupo humano 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> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H2 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H3 del grupo humano 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: estructura consenso H4 del grupo humano 3

<400> 109

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

<210> 110

<211> 648

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada injertada para Fab

<400> 110

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

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt 648

<210> 111

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada injertada para 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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera injertada para Fab y Fab modificado

<400> 112

gacattcaaa tgacccagag cccatccagc ctgagcggcat ctgtaggaga ccgggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggt actaacgtag cctggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaagcgct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
aggttcagcg gatccggtag tggtactgat ttcaccctca cgatcagtag cctccagccg 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct accccactcac attcggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa agctttaat agaggagagt gt 642

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera injertada para Fab y Fab modificado

<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> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada injertada para fab modificado

<400> 114

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

<210> 115

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada injertada para fab modificado

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Ala Ala
225

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE TIENEN ESPECIFICIDAD POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA HUMANO, Y USO DE LAS MISMAS

Resumen

Se describen moléculas de anticuerpo que contienen al menos una CDR procedente de un anticuerpo monoclonal de ratón que tiene especificidad por el TNFα humano. También se describe un anticuerpo de CDR injertadas en el que al menos una de las CDR es una CDR híbrida. También se describen secuencias de ADN que codifican las cadenas de las moléculas de anticuerpo, vectores, células huésped transformadas y usos de las moléculas de anticuerpo en el tratamiento de enfermedades mediadas por TNFαp

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/94585 A1

(51) International Patent Classification[7]: C12N 15/13, C07K 16/24, 16/46, A61K 47/48, C07K 19/00, C12N 15/62, 15/70, 1/21, A61K 39/395, A61P 19/02, 37/06

(21) International Application Number: PCT/GB01/03477

(22) International Filing Date: 5 June 2001 (05.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0013810.7 6 June 2000 (06.06.2000) GB

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: CELLTECH R & D LIMITED [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ATHWAL, Diljeet, Singh [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). BROWN, Derek, Thomas [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). WEIR, Andrew, Neil, Charles [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). POPPLEWELL, Andrew, George [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). CHAPMAN, Andrew, Paul [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). KING, David, John [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB).

(74) Agents: MERCER, Christopher, Paul et al.; Carpmaels & Ransford, 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA (GB).

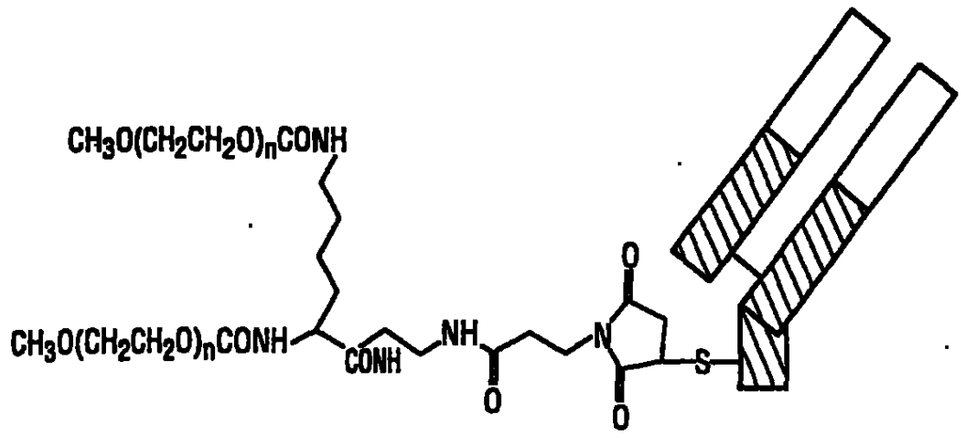
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIBODY MOLECULES HAVING SPECIFICITY FOR HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA, AND USE THEREOF



(57) Abstract: There is disclosed antibody molecules containing at least one CDR derived from a mouse monoclonal antibody having specificity for human TNFα. There is also disclosed a CDR grafted antibody wherein at least one of the CDRs is a hybrid CDR. Further disclosed are DNA sequences encoding the chains of the antibody molecules, vectors, transformed host cells and uses of the antibody molecules in the treatment of diseases mediated by TNFα.

WO 01/94585 A1

ANTIBODY MOLECULES HAVING SPECICITY FOR HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA, AND USE THEREOF

The present invention relates to an antibody molecule having specificity for antigenic determinants of human tumour necrosis factor alpha (TNFα). The present invention also relates to the therapeutic uses of the antibody molecule and methods for producing the antibody molecule.

This invention relates to antibody molecules. In an antibody molecule, there are two heavy chains and two light chains. Each heavy chain and each light chain has at its N-terminal end a variable domain. Each variable domain is composed of four framework regions (FRs) alternating with three complementarily determining regions (CDRs). The residues in the variable domains are conventionally numbered according to a system devised by Kabat *et al.* This system is set forth in Kabat *et al.*, 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (hereafter "Kabat *et al.* (*supra*)"). This numbering system is used in the present specification except where otherwise indicated.

The Kabat residue designations do not always correspond directly with the linear numbering of the amino acid residues. The actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids than in the strict Kabat numbering corresponding to a shortening of, or insertion into, a structural component, whether framework or CDR, of the basic variable domain structure. The correct Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment of residues of homology in the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence.

The CDRs of the heavy chain variable domain are located at residues 31-35 (CDRH1), residues 50-65 (CDRH2) and residues 95-102 (CDRH3) according to the Kabat numbering.

The CDRs of the light chain variable domain are located at residues 24-34 (CDRL1), residues 50-56 (CDRL2) and residues 89-97 (CDRL3) according to the Kabat numbering.

Construction of CDR-grafted antibodies is described in European Patent Application EP-A-0239400, which discloses a process in which the CDRs of a mouse monoclonal antibody are grafted onto the framework regions of the variable domains of a human immunoglobulin by site directed mutagenesis using long oligonucleotides. The

CDRs determine the antigen binding specificity of antibodies and are relatively short peptide sequences carried on the framework regions of the variable domains.

The earliest work on humanising monoclonal antibodies by CDR-grafting was carried out on monoclonal antibodies recognising synthetic antigens, such as NP. However, examples in which a mouse monoclonal antibody recognising lysozyme and a rat monoclonal antibody recognising an antigen on human T-cells were humanised by CDR-grafting have been described by Verhoeyen *et al.* (Science, 239, 1534-1536, 1988) and Riechmann *et al.* (Nature, 332, 323-324, 1988), respectively.

Riechmann *et al.*, found that the transfer of the CDRs alone (as defined by Kabat (Kabat *et al.* (*supra*) and Wu *et al.*, J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) was not sufficient to provide satisfactory antigen binding activity in the CDR-grafted product. It was found that a number of framework residues have to be altered so that they correspond to those of the donor framework region. Proposed criteria for selecting which framework residues need to be altered are described in International Patent Application WO 90/07861.

A number of reviews discussing CDR-grafted antibodies have been published, including Vaughan *et al.* (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

TNFα is a pro-inflammatory cytokine that is released by and interacts with cells of the immune system. Thus, TNFα is released by macrophages that have been activated by lipopolysaccharides (LPS) of gram negative bacteria. As such, TNFα appears to be an endogenous mediator of central importance involved in the development and pathogenesis of endotoxic shock associated with bacterial sepsis. TNFα has also been shown to be up-regulated in a number of human diseases, including chronic diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis and multiple sclerosis. Mice transgenic for human TNFα produce high levels of TNFα constitutively and develop a spontaneous, destructive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis (Kaffer *et al.*, EMBO J., 10, 4025-4031, 1991). TNFα is therefore referred to as a pro-inflammatory cytokine.

Monoclonal antibodies against TNFα have been described in the prior art. Meager *et al.*, (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) describe murine monoclonal antibodies against recombinant TNFα. Fendly *et al.*, (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) describe the use of murine monoclonal antibodies against recombinant TNFα in defining neutralising epitopes on TNF. Shimamoto *et al.*, (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) describe the use of murine monoclonal antibodies against TNFγ and their use in preventing endotoxic shock in mice. Furthermore, in International Patent Application WO 92/11383, recombinant

antibodies, including CDR-grafted antibodies, specific for TNFα are disclosed. Rankin *et al.*, (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) describe the use of such CDR-grafted antibodies in the treatment of rheumatoid arthritis. US-A-5 919 452 discloses anti-TNF chimeric antibodies and their use in treating pathologies associated with the presence of TNF.

Antibodies to TNFα have been proposed for the prophylaxis and treatment of endotoxic shock (Beutler *et al.*, Science, 234, 470-474, 1985). Bodmer *et al.*, (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) and Wherry *et al.*, (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) discuss the therapeutic potential of anti-TNFα antibodies in the treatment of septic shock. The use of anti-TNFα antibodies in the treatment of septic shock is also discussed by Kirschenbaum *et al.*, (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). Collagen-induced arthritis can be treated effectively using an anti-TNFα monoclonal antibody (Williams *et al.* (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

Increased levels of TNFα are found in both the synovial fluid and peripheral blood of patients suffering from rheumatoid arthritis. When TNFα blocking agents are administered to patients suffering from rheumatoid arthritis, they reduce inflammation, improve symptoms and retard joint damage (McKown *et al.* (Arthritis Rheum., 42, 1204-1208, 1999).

The use of anti-TNFα antibodies in the treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease is discussed in Feldman *et al.*, (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini *et al.*, (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) and in Feldman *et al.*, (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). The antibodies to TNFα used in such treatments are generally chimeric antibodies, such as those described in US-A-5 919 452.

Two TNFα blocking products are currently licensed for the treatment of rheumatoid arthritis. The first, called etanercept, is marketed by Immunex Corporation as Enbrel ™. It is a recombinant fusion protein comprising two p75 soluble TNF-receptor domains linked to the Fc portion of a human immunoglobulin. The second, called infliximab, is marketed by Centocor Corporation as Remicade™. It is a chimeric antibody having murine anti-TNFα variable domains and human IgG1 constant domains.

The prior art recombinant anti-TNFα antibody molecules generally have a reduced affinity for TNFα compared to the antibodies from which the variable regions or CDRs are

derived, generally have to be produced in mammalian cells and are expensive to manufacture. Prior art anti-TNFα antibodies are described in Stephens *et al.*, (Immunology, 85; 668-674, 1995), GB-A-2 246 570 and GB-A-2 297 145.

There is a need for an antibody molecule to treat chronic inflammatory diseases which can be used repeatedly and produced easily and efficiently. There is also a need for an antibody molecule which has high affinity for TNFα and low immunogenicity in humans.

In a first aspect, the present invention provides an antibody molecule having specificity for TNFα, comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) having the sequence given as H1 in Figure 3 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2' in Figure 3 (SEQ ID NO:2) or as H2 in Figure 3 (SEQ ID NO:7) for CDRH2 or as H3 in Figure 3 (SEQ ID NO:3) for CDRH3.

The antibody molecule of the first aspect of the present invention comprises at least one CDR selected from H1, H2' or H2 and H3 (SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:3) for the heavy chain variable domain. Preferably, the antibody molecule comprises at least two and more preferably all three CDRs in the heavy chain variable domain.

In a second aspect of the present invention, there is provided an antibody molecule having specificity for human TNFα, comprising a light chain wherein the variable domain comprises a CDR (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) having the sequence given as L1 in Figure 3 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, L2 in Figure 3 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or L3 in Figure 3 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

The antibody molecule of the second aspect of the present invention comprises at least one CDR selected from L1, L2 and L3 (SEQ ID NO:4 to SEQ ID NO:6) for the light chain variable domain. Preferably, the antibody molecule comprises at least two and more preferably all three CDRs in the light chain variable domain.

The antibody molecules of the first and second aspects of the present invention preferably have a complementary light chain or a complementary heavy chain, respectively.

Preferably, the antibody molecule of the first or second aspect of the present invention comprises a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) having the sequence given as H1 in Figure 3 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2' or H2 in Figure 3 (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:7) for CDRH2 or as H3 in Figure 3 (SEQ ID NO:3) for CDRH3 and a light chain wherein the variable

domain comprises a CDR (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) having the sequence given as L1 in Figure 3 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, as L2 in Figure 3 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or as L3 in Figure 3 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

The CDRs given in SEQ IDS NOS:1 and 3 to 7 and in Figure 3 referred to above are derived from a mouse monoclonal antibody hTNF40. However, SEQ ID NO:2 consists of a hybrid CDR. The hybrid CDR comprises part of heavy chain CDR2 from mouse monoclonal antibody hTNF40 (SEQ ID NO:7) and part of heavy chain CDR2 from a human group 3 germline V region sequence.

The complete sequences of the variable domains of the mouse hTNF40 antibody are shown in Figures 6 (light chain) (SEQ ID NO:99) and Figure 7 (heavy chain) (SEQ ID NO:100). This mouse antibody is referred to below as "the donor antibody".

A first alternatively preferred embodiment of the first or second aspect of the present invention is the mouse monoclonal antibody hTNF40 having the light and heavy chain variable domain sequences shown in Figure 6 (SEQ ID NO:99) and Figure 7 (SEQ ID NO:100), respectively. The light chain constant region of hTNF40 is kappa and the heavy chain constant region is IgG2a.

In a second alternatively preferred embodiment, the antibody according to either of the first and second aspects of the present invention is a chimeric mouse/human antibody molecule, referred to herein as the chimeric hTNF40 antibody molecule. The chimeric antibody molecule comprises the variable domains of the mouse monoclonal antibody hTNF40 (SEQ ID NOS:99 and 100) and human constant domains. Preferably, the chimeric hTNF40 antibody molecule comprises the human C kappa domain (Hieter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; Genebank accession number J00241) in the light chain and the human gamma 4 domains (Flanagan *et al.*, Nature, 300, 709-713, 1982) in the heavy chain.

In a third alternatively preferred embodiment, the antibody according to either of the first and second aspects of the present invention is a CDR-grafted antibody molecule. The term "a CDR-grafted antibody molecule" as used herein refers to an antibody molecule wherein the heavy and/or light chain contains one or more CDRs (including, if desired, a hybrid CDR) from the donor antibody (e.g. a murine monoclonal antibody) grafted into a heavy and/or light chain variable region framework of an acceptor antibody (e.g. a human antibody).

Preferably, such a CDR-grafted antibody has a variable domain comprising human acceptor framework regions as well as one or more of the donor CDRs referred to above.

When the CDRs are grafted, any appropriate acceptor variable region framework sequence may be used having regard to the class/type of the donor antibody from which the CDRs are derived, including mouse, primate and human framework regions. Examples of human frameworks which can be used in the present invention are KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY and POM (Kabat *et al. (supra)*). For example, KOL and NEWM can be used for the heavy chain, REI can be used for the light chain and EU, LAY and POM can be used for both the heavy chain and the light chain. The preferred framework regions for the light chain are the human group 1 framework regions shown in Figure 1 (SEQ ID NOS:83, 85, 87 and 89). The preferred framework regions for the heavy chain are the human group 1 and group 3 framework regions shown in Figure 2 (SEQ ID NOS:91, 93, 95 and 97 and SEQ ID NOS:106, 107, 108 and 109), respectively.

In a CDR-grafted antibody of the present invention, it is preferred to use as the acceptor antibody one having chains which are homologous to the chains of the donor antibody. The acceptor heavy and light chains do not necessarily need to be derived from the same antibody and may, if desired, comprise composite chains having framework regions derived from different chains.

Also, in a CDR-grafted antibody of the present invention, the framework regions need not have exactly the same sequence as those of the acceptor antibody. For instance, unusual residues may be changed to more frequently-occurring residues for that acceptor chain class or type. Alternatively, selected residues in the acceptor framework regions may be changed so that they correspond to the residue found at the same position in the donor antibody. Such changes should be kept to the minimum necessary to recover the affinity of the donor antibody. A protocol for selecting residues in the acceptor framework regions which may need to be changed is set forth in WO 91/09967.

Preferably, in a CDR-grafted antibody molecule of the present invention, if the acceptor heavy chain has human group 1 framework regions (shown in Figure 2) (SEQ ID NOS:91, 93, 95 and 97), then the acceptor framework regions of the heavy chain comprise, in addition to one or more donor CDRs, donor residues at positions 28, 69 and 71 (according to Kabat *et al. (supra)*).

Alternatively, if the acceptor heavy chain has group 1 framework regions, then the acceptor framework regions of the heavy chain comprise, in addition to one or more donor CDRs, donor residues at positions 28, 38, 46, 67, 69 and 71 (according to Kabat *et al. (supra)*.

Preferably, in a CDR-grafted antibody molecule of the present invention, if the acceptor heavy chain has human group 3 framework regions (shown in Figure 2) (SEQ ID NOS:106, 107, 108 and 109), then the acceptor framework regions of the heavy chain comprise, *in addition to one or more donor CDRs, donor residues at positions* 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 and 78 (according to Kabat *et al. (supra)*).

Preferably, in a CDR-grafted antibody molecule according to the present invention, if the acceptor light chain has human group 1 framework regions (shown in Figure 1) (SEQ ID NOS:83, 85, 87 and 89) then the acceptor framework regions of the light chain comprise donor residues at positions 46 and 60 (according to Kabat *et al. (supra)*).

Donor residues are residues from the donor antibody, i.e. the antibody from which the CDRs were originally derived.

The antibody molecule of the present invention may comprise: a complete antibody molecule, having full length heavy and light chains; a fragment thereof, such as a Fab, modified Fab, Fab', $F(ab')_2$ or Fv fragment; a light chain or heavy chain monomer or dimer; a single chain antibody, e.g. a single chain Fv in which the heavy and light chain variable domains are joined by a peptide linker. Similarly, the heavy and light chain variable regions may be combined with other antibody domains as appropriate.

Preferably the antibody molecule of the present invention is a Fab fragment. Preferably the Fab fragment has a heavy chain having the sequence given as SEQ ID NO:111 and a light chain having the sequence given as SEQ ID NO:113. The amino acid sequences given in SEQ ID NO:111 and SEQ ID NO:113 are preferably encoded by the nucleotide sequences given in SEQ ID NO:110 and SEQ ID NO:112, respectively.

Alternatively, it is preferred that the antibody molecule of the present invention is a modified Fab fragment wherein the modification is the addition to the C-terminal end of its heavy chain one or more amino acids to allow the attachment of an effector or reporter molecule. Preferably, the additional amino acids form a modified hinge region containing one or two cysteine residue to which the effector or reporter molecule may be attached. Such a modified Fab fragment preferably has a heavy chain having the sequence given as SEQ ID NO:115 and the light chain having the sequence given as SEQ ID NO:113. The amino acid sequence given in SEQ ID NO:115 is preferably encoded by the nucleotide sequence given in SEQ ID NO:114.

A preferred effector group is a polymer molecule, which may be attached to the modified Fab fragment to increase its half-life *in vivo*.

The polymer molecule may, in general, be a synthetic or a naturally occurring polymer, for example an optionally substituted straight or branched chain polyalkylene, polyalkenylene or polyoxyalkylene polymer or a branched or unbranched polysaccharide, e.g. a homo- or hetero- polysaccharide.

Particular optional substituents which may be present on the above-mentioned synthetic polymers include one or more hydroxy, methyl or methoxy groups. Particular examples of synthetic polymers include optionally substituted straight or branched chain poly(ethyleneglycol), poly(propyleneglycol) poly(vinylalcohol) or derivatives thereof, especially optionally substituted poly(ethyleneglycol) such as methoxypoly(ethyleneglycol) or derivatives thereof. Particular naturally occurring polymers include lactose, amylose, dextran, glycogen or derivatives thereof. "Derivatives" as used herein is intended to include reactive derivatives, for example thiol-selective reactive groups such as maleimides and the like. The reactive group may be linked directly or through a linker segment to the polymer. It will be appreciated that the residue of such a group will in some instances form part of the product as the linking group between the antibody fragment and the polymer.

The size of the polymer may be varied as desired, but will generally be in an average molecular weight range from 500Da to 50000Da, preferably from 5000 to 4000Da and more preferably from 25000 to 4000Da. The polymer size may in particular be selected on the basis of the intended use of the product. Thus, for example, where the product is intended to leave the circulation and penetrate tissue, for example for use in the treatment of a tumour, it may be advantageous to use a small molecular weight polymer, for example with a molecular weight of around 5000Da. For applications where the product remains in the circulation, it may be advantageous to use a higher molecular weight polymer, for example having a molecular weight in the range from 25000Da to 40000Da.

Particularly preferred polymers include a polyalkylene polymer, such as a poly(ethyleneglycol) or, especially, a methoxypoly(ethyleneglycol) or a derivative thereof, and especially with a molecular weight in the range from about 25000Da to about 40000Da.

Each polymer molecule attached to the modified antibody fragment may be covalently linked to the sulphur atom of a cysteine residue located in the fragment. The covalent linkage will generally be a disulphide bond or, in particular, a sulphur-carbon bond.

Where desired, the antibody fragment may have one or more effector or reporter molecules attached to it. The effector or reporter molecules may be attached to the antibody fragment through any available amino acid side-chain or terminal amino acid functional group located in the fragment, for example any free amino, imino, hydroxyl or carboxyl group.

An activated polymer may be used as the starting material in the preparation of polymer-modified antibody fragments as described above. The activated polymer may be any polymer containing a thiol reactive group such as an α-halocarboxylic acid or ester, e.g. iodoacetamide, an imide, e.g. maleimide, a vinyl sulphone or a disulphide. Such starting materials may be obtained commercially (for example from Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) or may be prepared from commercially available starting materials using conventional chemical procedures.

As regards attaching poly(ethyleneglycol) (PEG) moieties, reference is made to "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

Where it is desired to obtain an antibody fragment linked to an effector or reporter molecule, this may be prepared by standard chemical or recombinant DNA procedures in which the antibody fragment is linked either directly or via a coupling agent to the effector or reporter molecule either before or after reaction with the activated polymer as appropriate. Particular chemical procedures include, for example, those described in WO 93/62331, WO 92/22583, WO 90,195 and WO 89/1476. Alternatively, where the effector or reporter molecule is a protein or polypeptide the linkage may be achieved using recombinant DNA procedures, for example as described in WO 86/01533 and EP-A-0392745.

Preferably, the modified Fab fragment of the present invention is PEGylated (i.e. has PEG (poly(ethyleneglycol)) covalently attached thereto) according to the method disclosed in EP-A-0948544. Preferably the antibody molecule of the present invention is a PEGylated modified Fab fragment as shown in Figure 13. As shown in Figure 13, the modified Fab fragment has a maleimide group covalently linked to a single thiol group in a modified hinge region. A lysine residue is covalently linked to the maleimide group. To

each of the amine groups on the lysine residue is attached a methoxypoly(ethyleneglycol) polymer having a molecular weight of approximately 20,000 Da. The total molecular weight of the entire effector molecule is therefore approximately 40,000 Da.

Preferably, in the compound shown in Figure 13, the heavy chain of the antibody part has the sequence given as SEQ ID NO:115 and the light chain has the sequence given in SEQ ID NO:113. This compound is referred to herein as CDP870.

The constant region domains of the antibody molecule of the present invention, if present, may be selected having regard to the proposed function of the antibody molecule, and in particular the effector functions which may be required. For example, the constant region domains may be human IgA, IgD, IgE, IgG or IgM domains. In particular, human IgG constant region domains may be used, especially of the IgG1 and IgG3 isotypes when the antibody molecule is intended for therapeutic uses and antibody effector functions are required. Alternatively, IgG2 and IgG4 isotypes may be used when the antibody molecule is intended for therapeutic purposes and antibody effector functions are not required, e.g. for simply blocking TNFα activity.

Also, the antibody molecule of the present invention may have an effector or a reporter molecule attached to it. For instance, it may have a macrocycle, for chelating a heavy metal atom, or a toxin, such as ricin, attached to it by a covalent bridging structure. Alternatively, procedures of recombinant DNA technology may be used to produce an antibody molecule in which the Fc fragment (CH2, CH3 and hinge domains), the CH2 and CH3 domains or the CH3 domain of a complete immunoglobulin molecule has (have) been replaced by, or has attached thereto by peptide linkage, a functional non-immunoglobulin protein, such as an enzyme or toxin molecule.

The antibody molecule of the present invention preferably has a binding affinity of at least 0.85×10^{-10} M, more preferably at least 0.75×10^{-10} M and most preferably at least 0.5×10^{-10} M. (It is worth noting that the preferred humanised antibody molecule of the present invention, as described below, has an affinity of about 0.5×10^{-10} M, which is better than the affinity of the murine monoclonal antibody from which it is derived. The murine antibody has an affinity of about 0.85×10^{-10} M.)

Preferably, the antibody molecule of the present invention comprises the light chain variable domain hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8) and the heavy chain variable domain gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11). The sequences of the variable domains of these light and heavy chains are shown in Figures 8 and 11, respectively.

The present invention also relates to variants of the antibody molecule of the present invention, which have an improved affinity for TNFα. Such variants can be obtained by a number of affinity maturation protocols including mutating the CDRs (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), chain shuffling (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), use of mutator strains of *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), DNA shuffling (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), phage display (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) and sexual PCR (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) discusses these methods of affinity maturation.

The present invention also provides a DNA sequence encoding the heavy and/or light chain(s) of the antibody molecule of the present invention.

Preferably, the DNA sequence encodes the heavy or the light chain of the antibody molecule of the present invention.

In one preferred embodiment, the DNA sequence encodes a light chain and comprises the sequence shown in SEQ ID NO:8 (hTNF40-gL1) or SEQ ID NO:9 (h-TNF-40-gL2) or a degenerate equivalent thereof.

In an alternatively preferred embodiment, the DNA sequence encodes a heavy chain and comprises the sequence shown in SEQ ID NO:10 (gh1hTNF40.4) or SEQ ID NO:11 (gh3hTNF40.4) or a degenerate equivalent thereof.

The DNA sequence of the present invention may comprise synthetic DNA, for instance produced by chemical processing, cDNA, genomic DNA or any combination thereof.

The present invention also relates to a cloning or expression vector comprising one or more DNA sequences of the present invention. Preferably, the cloning or expression vector comprises two DNA sequences, encoding the light chain and the heavy chain of the antibody molecule of the present invention, respectively.

In a preferred embodiment, the present invention provides an *E. coli* expression vector comprising a DNA sequence of the present invention. Preferably the expression vector is pTTO(CDP870) as shown schematically in Figure 22.

The present invention also comprises vector pDNAbEng-G1 as shown in Figure 19.

General methods by which the vectors may be constructed, transfection methods and culture methods are well known to those skilled in the art. In this respect, reference is made to "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley

Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

DNA sequences which encode the antibody molecule of the present invention can be obtained by methods well known to those skilled in the art. For example, DNA sequences coding for part or all of the antibody heavy and light chains may be synthesised as desired from the determined DNA sequences or on the basis of the corresponding amino acid sequences.

DNA coding for acceptor framework sequences is widely available to those skilled in the art and can be readily synthesised on the basis of their known amino acid sequences.

Standard techniques of molecular biology may be used to prepare DNA sequences coding for the antibody molecule of the present invention. Desired DNA sequences may be synthesised completely or in part using oligonucleotide synthesis techniques. Site-directed mutagenesis and polymerase chain reaction (PCR) techniques may be used as appropriate.

Any suitable host cell/vector system may be used for expression of the DNA sequences encoding the antibody molecule of the present invention. Bacterial, for example *E. coli*, and other microbial systems may be used, in part, for expression of antibody fragments such as Fab and $F(ab')_2$ fragments, and especially Fv fragments and single chain antibody fragments, for example, single-chain Fvs. Eukaryotic, e.g. mammalian, host cell expression systems may be used for production of larger antibody molecules, including complete antibody molecules. Suitable mammalian host cells include CHO, myeloma or hybridoma cells.

The present invention also provides a process for the production of an antibody molecule according to the present invention comprising culturing a host cell comprising a vector of the present invention under conditions suitable for leading to expression of protein from DNA encoding the antibody molecule of the present invention, and isolating the antibody molecule.

Preferably the process for the production of the antibody molecule of the present invention comprises culturing *E. coli* comprising an *E. coli* expression vector comprising the DNA sequence of the present invention under conditions suitable for leading to expression of protein from the DNA sequence and isolating the antibody molecule. The antibody molecule may be secreted from the cell or targeted to the periplasm by suitable signal sequences. Alternatively, the antibody molecules may accumulate within the cell's cytoplasm. Preferably the antibody molecule is targeted to the periplasm. Depending on

the antibody molecule being produced and the process used, it is desirable to allow the antibody molecules to refold and adopt a functional conformation. Procedures for allowing antibody molecules to refold are well known to those skilled in the art.

The antibody molecule may comprise only a heavy or light chain polypeptide, in which case only a heavy chain or light chain polypeptide coding sequence needs to be used to transfect the host cells. For production of products comprising both heavy and light chains, the cell line may be transfected with two vectors, a first vector encoding a light chain polypeptide and a second vector encoding a heavy chain polypeptide. Alternatively, a single vector may be used, the vector including sequences encoding light chain and heavy chain polypeptides.

The present invention also provides a therapeutic or diagnostic composition comprising an antibody molecule of the present invention in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

The present invention also provides a process for preparation of a therapeutic or diagnostic composition comprising admixing the antibody molecule of the present invention together with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

The antibody molecule may be the sole active ingredient in the therapeutic or diagnostic composition or may be accompanied by other active ingredients including other antibody ingredients, for example anti-T cell, anti-IFNγ or anti-LPS antibodies, or non-antibody ingredients such as xanthines.

The pharmaceutical compositions should preferably comprise a therapeutically effective amount of the antibody of the invention. The term "therapeutically effective amount" as used herein refers to an amount of a therapeutic agent needed to treat, ameliorate or prevent a targeted disease or condition, or to exhibit a detectable therapeutic or preventative effect. For any antibody, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually in rodents, rabbits, dogs, pigs or primates. The animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

The precise effective amount for a human subject will depend upon the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities and tolerance/response to therapy. This amount can be determined by routine experimentation

and is within the judgement of the clinician. Generally, an effective dose will be from 0.01 mg/kg to 50 mg/kg, preferably 0.1 mg/kg to 20 mg/kg, more preferably about 15 mg/kg. As shown in the Examples below, doses of 1, 5 and 20 mg/kg have been used to treat patients suffering from rheumatoid arthritis.

Compositions may be administered individually to a patient or may be administered in combination with other agents, drugs or hormones.

The dose at which the antibody molecule of the present invention is administered depends on the nature of the condition to be treated, the degree to which the level of TNFα to be neutralised is, or is expected to be, raised above a desirable level, and on whether the antibody molecule is being used prophylactically or to treat an existing condition.

Thus, for example, where the product is for treatment or prophylaxis of a chronic inflammatory disease, such as rheumatoid arthritis, suitable doses of the antibody molecule of the present invention lie in the range of between 0.5 and 50 mg/kg, more preferably between 1 and 20 mg/kg and most preferably about 15 mg/kg. The frequency of dose will depend on the half-life of the antibody molecule and the duration of its effect.

If the antibody molecule has a short half-life (e.g. 2 to 10 hours) it may be necessary to give one or more doses per day. Alternatively, if the antibody molecule has a long half life (e.g. 2 to 15 days) it may only be necessary to give a dosage once per day, per week or even once every 1 or 2 months.

A pharmaceutical composition may also contain a pharmaceutically acceptable carrier for administration of the antibody. The carrier should not itself induce the production of antibodies harmful to the individual receiving the composition and should not be toxic. Suitable carriers may be large, slowly metabolised macromolecules such as proteins, polypeptides, liposomes, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers and inactive virus particles.

Pharmaceutically acceptable salts can be used, for example mineral acid salts, such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates and sulphates, or salts of organic acids, such as acetates, propionates, malonates and benzoates.

Pharmaceutically acceptable carriers in therapeutic compositions may additionally contain liquids such as water, saline, glycerol and ethanol. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents or pH buffering substances, may be present in such compositions. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be

formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries and suspensions, for ingestion by the patient.

Preferred forms for administration include forms suitable for parenteral administration, e.g. by injection or infusion, for example by bolus injection or continuous infusion. Where the product is for injection or infusion, it may take the form of a suspension, solution or emulsion in an oily or aqueous vehicle and it may contain formulatory agents, such as suspending, preservative, stabilising and/or dispersing agents. Alternatively, the antibody molecule may be in dry form, for reconstitution before use with an appropriate sterile liquid.

Once formulated, the compositions of the invention can be administered directly to the subject. The subjects to be treated can be animals. However, it is preferred that the compositions are adapted for administration to human subjects.

The pharmaceutical compositions of this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, transcutaneous (for example, see WO98/20734), subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, intravaginal or rectal routes. Hyposprays may also be used to administer the pharmaceutical compositions of the invention. Typically, the therapeutic compositions may be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. Solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection may also be prepared.

Direct delivery of the compositions will generally be accomplished by injection, subcutaneously, intraperitoneally, intravenously or intramuscularly, or delivered to the interstitial space of a tissue. The compositions can also be administered into a lesion. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule.

It will be appreciated that the active ingredient in the composition will be an antibody molecule. As such, it will be susceptible to degradation in the gastrointestinal tract. Thus, if the composition is to be administered by a route using the gastrointestinal tract, the composition will need to contain agents which protect the antibody from degradation but which release the antibody once it has been absorbed from the gastrointestinal tract.

A thorough discussion of pharmaceutically acceptable carriers is available in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

It is also envisaged that the antibody of the present invention will be administered by use of gene therapy. In order to achieve this, DNA sequences encoding the heavy and light chains of the antibody molecule under the control of appropriate DNA components are introduced into a patient such that the antibody chains are expressed from the DNA sequences and assembled *in situ*.

The present invention also provides the antibody molecule of the present invention for use in treating a disease mediated by TNFα.

The present invention further provides the use of the antibody molecule according to the present invention in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease mediated by TNFα.

The antibody molecule of the present invention may be utilised in any therapy where it is desired to reduce the level of biologically active TNFα present in the human or animal body. The TNFα may be circulating in the body or present in an undesirably high level localised at a particular site in the body.

For example, elevated levels of TNFα are implicated in acute and chronic immune and immunoregulatory disorders, infections including septic, endotoxic and cardiovascular shock, inflammatory disorders, neurodegenerative diseases, malignant diseases and alcohol induced hepatitis. Details of the numerous disorders associated with elevated levels of TNFα are set out in US-A-5 919 452. The antibody molecule of the present invention may be utilised in the therapy of diseases mediated by TNFα. Particularly relevant diseases which may be treated by the antibody molecule of the present invention include sepsis, congestive heart failure, septic or endotoxic shock, cachexia, adult respiratory distress syndrome, AIDS, allergies, psoriasis, TB, inflammatory bone disorders, blood coagulation disorders, burns, rejection episodes following organ or tissue transplant, Crohn's disease and autoimmune diseases, such as thyroiditis and rheumatoid- and osteo-arthritis.

Additionally, the antibody molecule or composition may be used: to reduce side effects associated with TNFα generation during neoplastic therapy; to eliminate or reduce shock-related symptoms associated with the treatment or prevention of graft rejection by use of an anti-lymphocyte antibody; or for treating multi-organ failure.

The antibody molecule of the present invention is preferably used for treatment of rheumatoid- or osteo-arthritis.

The present invention also provides a method of treating human or animal subjects suffering from or at risk of a disorder mediated by TNFα, the method comprising

administering to the subject an effective amount of the antibody molecule of the present invention.

The antibody molecule of the present invention may also be used in diagnosis, for example in the *in vivo* diagnosis and imaging of disease states involving elevated levels of TNFα.

The present invention also provides an antibody molecule comprising a hybrid CDR comprising a truncated donor CDR sequence wherein the missing portion of the truncated donor CDR is replaced by a different sequence and forms a functional CDR. The term "hybrid CDR" as used herein means a CDR comprising a donor CDR which has been truncated at one or more positions, for example at one or both of its ends. The missing portion of the truncated donor CDR is replaced by a different sequence to form a complete and functional CDR. The hybrid CDR has at least one amino acid change compared to the complete donor CDR. The sequence replacing the truncated portion of the CDR can be any sequence. Preferably the non-donor part of the CDR sequence is from the antibody from which the framework regions of the antibody molecule are derived, such as a germline antibody sequence.

It has been found that antibody molecules comprising a hybrid CDR retain substantially the same binding affinity as an antibody molecule comprising complete donor CDRs. The term "substantially the same binding affinity" as used herein means at least 70%, more preferably at least 85% and most preferably at least 95% of the binding affinity of the corresponding antibody molecule comprising complete donor CDRs. As noted above, in certain cases, the affinity of the antibody of the invention may be greater than that of the donor antibody. The use of a hybrid CDR provides the advantages of reducing the amount of foreign (i.e. donor) sequence present in the antibody molecule and may increase the binding affinity of the antibody molecule compared to the corresponding antibody molecule comprising complete donor CDRs.

Any of the CDRs of the antibody molecule can be hybrid. Preferably CDR2 of the heavy chain is hybrid in the antibody molecule.

Preferably the truncation of the donor CDR is from 1 to 8 amino acids, more preferably from 4 to 6 amino acids. It is further preferred that the truncation is made at the C-terminus of the CDR.

Depending on the sequence of the truncated portion of the CDR and the sequence of the different sequence replacing the missing portion, a number of amino acid changes may

be made. Preferably at least 2 amino acid changes are made, more preferably at least 3 amino acid changes are made and most preferably at least 4 amino acid changes are made.

A particular embodiment of this aspect of the invention is an antibody according to the first aspect of the invention wherein the second CDR in the heavy chain has the sequence given as SEQ ID NO:2. This has better affinity for its antigen than does the donor antibody from which part of the CDR is derived.

The present invention also provides a nucleic acid sequence which encodes the antibody molecule comprising a hybrid CDR of the present invention.

The present invention also provides an expression vector containing the nucleic acid sequence encoding the antibody molecule comprising a hybrid CDR of the present invention.

The present invention also provides a host cell transformed with the vector of the present invention.

The present invention also provides a process for the production of an antibody molecule comprising a hybrid CDR comprising culturing the host cell of the present invention and isolating the antibody molecule.

The present invention is further described by way of illustration only in the following examples which refer to the accompanying Figures, in which:

Figure 1 shows the framework regions of the human light chain subgroup 1 compared to the framework regions of the hTNF40 light chain (SEQ ID NOS:83 to 90);

Figure 2 shows the framework regions of the human heavy chain subgroup 1 and subgroup 3 compared to the framework regions of the hTNF40 heavy chain (SEQ ID NOS:91 to 98 and 106 to 109);

Figure 3 shows the amino acid sequence of the CDRs of hTNF40 (SEQ ID NOS:1 to 7), wherein CDR H2' is a hybrid CDR wherein the C-terminal six amino acids are from the H2 CDR sequence of a human subgroup 3 germline antibody and the amino acid changes to the sequence resulting from this hybridisation are underlined;

Figure 4 shows vector pMR15.1;

Figure 5 shows vector pMR14;

Figure 6 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of the murine hTNF40Vl (SEQ ID NO: 99);

Figure 7 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of the murine hTNF40Vh (SEQ ID NO:100);

Figure 8 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8);

Figure 9 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of hTNF40-gL2 (SEQ ID NO:9);

Figure 10 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10);

Figure 11 shows the nucleotide and predicted amino acid sequence of gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11);

Figure 12 shows vector CTIL5-gL6;

Figure 13 shows the structure of a compound called CDP870 comprising a modified Fab fragment derived from antibody hTNF40 covalently linked via a cysteine residue to a lysyl-maleimide linker wherein each amino group on the lysyl residue has covalently attached to it a methoxy PEG residue wherein n is about 420;

Figure 14 shows vector pTTQ9;

Figure 15 shows the sequence of the OmpA oligonucleotide adapter (SEQ ID NO:101);

Figure 16 shows vector pACYC184;

Figure 17 shows vector pTTO-1;

Figure 18 shows vector pTTO-2;

Figure 19 shows vector pDNAbEng-G1;

Figure 20 shows the oligonucleotide cassettes encoding different intergenic sequences for *E. coli* modified Fab expression (SEQ ID NOS:102 to 105);

Figure 21 shows periplasmic modified Fab accumulation of IGS variants;

Figure 22 shows vector pTTO(CDP870);

Figure 23 shows the disease activity score (DAS) in patients treated with different doses of CDP870 and placebo. Median and IQ ranges are presented for the per-protocol population with last observation carried forward. Small squares indicate placebo, diamonds indicate 1 mg/kg, triangles indicate 5 mg/kg and large squares indicate 20 mg/kg;

Figure 24 shows the tender joint count, swollen joint count, pain score, assessor's global assessment of disease activity, modified health assessment questionnaire (HAQ), C reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) in patients treated with different doses of CDP870 and placebo. Median and IQ range are presented for the per-

protocol population with last observation carried forward. Small squares indicate placebo, diamonds indicate 1 mg/kg, triangles indicate 5 mg/kg and large squares indicate 20 mg/kg.

EXAMPLES

Gene Cloning and Expression of a Chimeric hTNF40 Antibody Molecule

RNA Preparation from hTNF40 Hybridoma Cells

Total RNA was prepared from 3 x 10^7 hTNF40 hybridoma cells as described below. Cells were washed in physiological saline and dissolved in RNAzol (0.2 ml per 10^6 cells). Chloroform (0.2 ml per 2 ml homogenate) was added, the mixture shaken vigorously for 15 seconds and then left on ice for 15 minutes. The resulting aqueous and organic phases were separated by centrifugation for 15 minutes in an Eppendorf centrifuge and RNA was precipitated from the aqueous phase by the addition of an equal volume of isopropanol. After 15 minutes on ice, the RNA was pelleted by centrifugation, washed with 70% ethanol, dried and dissolved in sterile, RNAse free water. The yield of RNA was 400 µg.

PCR Cloning of hTNF40 Vh and Vl

cDNA sequences coding for the variable domains of hTNF40 heavy and light chains were synthesised using reverse transcriptase to produce single stranded cDNA copies of the mRNA present in the total RNA, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) on the cDNAs with specific oligonucleotide primers.

a) **cDNA Synthesis**

cDNA was synthesised in a 20 µl reaction volume containing the following reagents: 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 20 units RNAsin, 75 ng random hexanucleotide primer, 2 µg hTNF40 RNA and 200 units Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 60 minutes, the reaction was terminated by heating at 95°C for 5 minutes.

b) **PCR**

Aliquots of the cDNA were subjected to PCR using combinations of primers specific for the heavy and light chains. The nucleotide sequences of the 5' primers for the heavy and light chains are shown in Tables 1 and 2 respectively. These sequences all contain, in order, a

restriction site starting 7 nucleotides from their 5' ends, the sequence GCCGCCACC (SEQ ID NO:12), to allow optimal translation of the resulting mRNAs, an initiation codon and 20-30 nucleotides based on the leader peptide sequences of known mouse antibodies (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

The 3' primers are shown in Table 3. The light chain primer spans the J-C junction of the antibody and contains a restriction site for the enzyme SpII to facilitate cloning of the V1 PCR fragment. The heavy chain 3' primers are a mixture designed to span the J-C junction of the antibody. The 3' primer includes an ApaI restriction site to facilitate cloning. The 3' region of the primers contains a mixed sequence based on those found in known mouse antibodies (Kabat *et al.*, 1991, *supra*).

The combinations of primers described above enable the PCR products for Vh and V1 to be cloned directly into an appropriate expression vector (see below) to produce chimeric (mouse-human) heavy and light chains and for these genes to be expressed in mammalian cells to produce chimeric antibodies of the desired isotype.

Incubations (100 µl) for the PCR were set up as follows. Each reaction contained 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 10 pmoles 5' primer mix (Table 4), 10 pmoles 3' primer (CL12 (light chain) or R2155 (heavy chain) (Table 3)), 1 µl cDNA and 1 unit Taq polymerase. Reactions were incubated at 95°C for 5 minutes and then cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, aliquots of each reaction were analysed by electrophoresis on an agarose gel. Light chain reactions containing 5' primer mixes from light chain pools 1, 2 and 7 produced bands with sizes consistent with full length Vl fragments while the reaction from heavy chain reaction pool 3 produced a fragment with a size expected of a Vh gene. The band produced by the light chain pool 1 primers was not followed up as previous results had shown that this band corresponds to a light chain pseudogene produced by the hybridoma cell. The band produced by the light chain pool 7 primers was weaker than the band from the pool 2 primers and therefore was not followed up. Only the band from light chain reaction pool 2, which was the strongest band, was followed up.

c) **Molecular Cloning of the PCR Fragments**

The DNA fragments produced in the light chain reaction pool 2 were digested with the enzymes *BstBI* and *SpII*, concentrated by ethanol precipitation, electrophoresed on a

1.4% agarose gel and DNA bands in the range of 400 base pairs recovered. These were cloned by ligation into the vector pMR15.1 (Figure 4) that had been restricted with BstBI and SplI. After ligation, mixtures were transformed into *E. coli* LM 1035 and plasmids from the resulting bacterial colonies screened for inserts by digestion with BstBI and Sp1I. Representatives with inserts from each ligation were analysed further by nucleotide sequencing.

In a similar manner, the DNA fragments produced in heavy chain reaction pool 3 were digested with HindIII and ApaI and cloned into the vector pMR14 (Figure 5) that had been restricted with HindIII and ApaI. Again, representative plasmids containing inserts were analysed by nucleotide sequencing.

d) **Nucleotide Sequence Analysis**

Plasmid DNA from a number of isolates containing Vh inserts was sequenced using the primers R1053 (see Table 5) (which primes in the 3' region of the HCMV promoter in pMR14) and R720 (see Table 5) (which primes in the 5' region of human C – gamma 4 and allows sequencing through the DNA insert on pMR14). It was found that the nucleotide sequences of the Vh insert in a number of clones were identical, except for differences in the signal peptide and J regions. This indicated that the clones examined are independent isolates arising from the use of different primers from the mixture of oligonucleotides during the PCR stage. The determined nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the variable domain of the heavy chain of antibody hTNF40 (hTNF40Vh) are given in Figure 7 (SEQ ID NO:100).

To analyse the light chain clones, the sequence derived from priming with R1053 (see Table 5) and R684 (SEQ ID NO:62) (which primes in the 5' region of human C-kappa and allows sequencing through the DNA insert on pMR15.1) was examined. The nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the Vl genes arising from reactions in pool 2 were similarly analysed. Again it was found that the nucleotide sequences of the Vl insert in a number of clones were identical, except for differences in the signal peptide and J regions, indicating that the clones examined were independent isolates arising from the use of different primers from the mixture of oligonucleotides used during the PCR stage. The determined nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the variable domain of the light chain of antibody hTNF40 (hTNF40V1) are given in Figure 6 (SEQ ID NO:99).

TABLE 1

Oligonucleotide primers for the 5' region of mouse heavy chains.

CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEQ ID NO:13)

CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEQ ID NO:14)

CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (SEQ ID NO:15)

CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEQ ID NO:16)

CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEQ ID NO:17)

CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEQ ID NO:18)

CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEQ ID NO:19)

CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEQ ID NO:20)

CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEQ ID NO:21)

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

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

CH12 : 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

Each of the above primers has the sequence 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:25) added to its 5' end.

TABLE 2

Oligonucleotide primers for the 5' region of mouse light chains.

CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:26)

CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEQ ID NO:27)

CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEQ ID NO:28)

CL4 : 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEQ ID NO:29)

CL5 : 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:30)

CL5A : 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:31)

CL6 : 5'ATGAGGT(T,G)C(T,C)(T,C)TG(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)CTG(A,G)G3'(SEQ ID NO:32)

CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEQ ID NO:33)

CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3'(SEQ ID NO:34)

CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)

CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTC3' (SEQ ID NO:36)

CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3'(SEQ ID NO:37)

CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEQ ID NO:38)

CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)

CL13 : 5'ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)

CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)

CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)

CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)

CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)

CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)

CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

Each of the above primers has the sequence 5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEQ ID NO:47) added to its 5' end.

TABLE 3

Oligonucleotide primers for the 3' ends of mouse Vh and Vl genes.

Light chain (CL12) :

5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEQ ID NO:48)

Heavy chain (R2155) :

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

TABLE 4

a) 5' Primer mixtures for light chain PCR reactions

pool 1 : CL2.
pool 2 : CL7.
pool 3 : CL13.
pool 4 : CL6.
pool 5 : CL5A, CL9, CL17A.
pool 6 : CL8.
pool 7 : CL12A.
pool 8 : CL1, CL3, CL4, CL5, CL10, CL11, CL2B, CL14, CL15, CL16, CL17B, CL17C

b) 5' Primer mixtures for heavy chain PCR reactions

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

Table 5

Primers used in nucleotide sequence analysis

R1053 : 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (SEQ ID NO:50)
R720 : 5'GCTCTCGGAGGTGCTCCT3' (SEQ ID NO:51)

Evaluation of Activities of Chimeric Genes

The activities of the chimeric genes were evaluated by expressing them in mammalian cells and purifying and quantitating the newly synthesised antibodies. The methodology for this is described below, followed by a description of the biochemical and cell based assays used for the biological characterisation of the antibodies.

a) **Production of Chimeric hTNF40 Antibody Molecule**

Chimeric antibody for biological evaluation was produced by transient expression of the appropriate heavy and light chain pairs after co-transfection into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using calcium phosphate precipitation.

On the day prior to transfection, semi-confluent flasks of CHO-L761 cells were trypsinised, the cells counted and T75 flasks set up each with 10^7 cells.

On the next day, the culture medium was changed 3 hours before transfection. For transfection, the calcium phosphate precipitate was prepared by mixing 1.25 ml of 0.25 M $CaCl_2$ containing 50 µg of each of heavy and light chain expression vectors with 1.25 ml of 2 x HBS (16.36 g NaCl, 11.0 g HEPES and 0.4 g Na_2HPO_4 in 1 litre water with the pH adjusted to 7.1 with NaOH) and adding immediately into the medium of the cells. After 3 hours at 37°C in a CO_2 incubator, the medium and precipitate were removed and the cells shocked by the addition of 15 ml 15% glycerol in phosphate buffered saline (PBS) for 1 minute. The glycerol was removed, the cells washed once with PBS and incubated for 48-96 hours in 25 ml medium containing 10 mM sodium butyrate. Antibody could be purified from the culture medium by binding to and elution from protein A-Sepharose.

b) ELISA

For the ELISA, Nunc ELISA plates were coated overnight at 4°C with a $F(ab)_2$ fragment of a polyclonal goat anti-human Fc fragment specific antibody (Jackson Immunoresearch, code 109-006-098) at 5 µg/ml in coating buffer (15 mM sodium carbonate, 35 mM sodium hydrogen carbonate, pH 6.9). Uncoated antibody was removed by washing 5 times with distilled water. Samples and purified standards to be quantitated were diluted to approximately 1 µg/ml in conjugate buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M NaCl, 0.2% v/v Tween 20, 0.2% w/v Hammersten casein). The samples were titrated in the microtitre wells in 2-fold dilutions to give a final volume of 0.1 ml in each well and the plates incubated at room temperature for 1 hour with shaking. After the first incubation step the plates were washed 10 times with distilled water and then incubated for 1 hour as before with 0.1 ml of a mouse monoclonal anti-human kappa (clone GD12) peroxidase conjugated antibody (The Binding Site, code MP135) at a dilution of 1 in 700 in conjugate buffer. The plate was washed again and substrate solution (0.1 ml) added to each well. Substrate solution contained 150 µl N,N,N,N-tetramethylbenzidine (10 mg/ml in DMSO), 150 µl hydrogen peroxide (30% solution) in 10 ml 0.1 M sodium acetate/sodium citrate, pH 6.0. The plate was developed for 5-10 minutes until the absorbance at 630 nm was approximately 1.0 for the top standard. Absorbance at 630 nm was measured using a plate reader and the concentration of the sample determined by comparing the titration curves with those of the standard.

c) **Determination of Affinity constants by BiaCore analysis.**

The binding interaction between hTNF40 and human TNF was investigated using BIA technology. An affinity purified goat polyclonal antibody, directed against the constant region of hTNF40, was immobilised on the dextran polymer sensor chip surface using standard NHS/EDC chemistry. Relatively low levels (200-500 RU) of hTNF40 were captured to ensure mass transport effects were minimised. Human TNF at different concentrations was passed over the captured hTNF40 to allow assessment of the association kinetics. Following the injection of ligand, buffer was passed over the surface so that the dissociation could be measured. The association and dissociation rate constants for the interaction between solid phase hTNF40 and human TNF were calculated, and a K_D value was derived.

EXAMPLE 1

CDR-Grafting of hTNF40

The molecular cloning of genes for the variable regions of the heavy and light chains of the hTNF40 antibody and their use to produce chimeric (mouse-human) hTNF40 antibodies has been described above. The nucleotide and amino acid sequences of the murine hTNF40 Vl and Vh are shown in Figures 6 and 7 (SEQ ID NOS:99 and 100), respectively. This example describes the CDR-grafting of the hTNF40 antibody.

CDR-Grafting of hTNF40 Light Chain

Alignment of the framework regions of hTNF40 light chain with those of the four human light chain subgroups (Kabat *et al.*, 1991, *supra*) revealed that hTNF40 was most homologous to antibodies in human light chain subgroup 1. Consequently, for constructing the CDR-grafted light chain, the framework regions chosen corresponded to those of the human group 1 consensus sequence.

A comparison of the amino acid sequences of the framework regions of murine hTNF40 and the consensus human group 1 light chains is given in Figure 1 and shows that there are 22 differences (underlined) between the two sequences. Analysis of the contribution that any of these framework differences might have on antigen binding identified 2 residues for investigation; these are at positions 46 and 60. Based on this analysis, two versions of the CDR-grafted light chain were constructed. In the first of these, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8), residues 46 and 60 are derived from the hTNF40 light

chain while in the second, hTNF40-gL2 (SEQ ID NO:9), all residues are human consensus except residue number 60 which is from the hTNF40 light chain.

Construction of CDR-Grafted Light Chain hTNF40-gL1.

The construction of hTNF40-gL1 is given below in detail. The following overlapping oligonucleotides (P7982-P7986) were used in the Polymerase Chain Reactions (PCR) to assemble a truncated grafted light chain. The assembled fragment lacks the antibody leader sequence and the first 17 amino acids of framework 1.

oligo 1 P7982:
5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAAGCCAGTCAGAACGTAGGTACTAAC GTAGCCTGGTATCAGCAAA3' (SEQ ID NO:52)

oligo 2 P7983:
5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTTACCTGGTTT TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEQ ID NO:53)

oligo 3 P7984:
5' TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTCAGCGGATCCG GTAGTGGTACTGATTTCAC3' (SEQ ID NO:54)

oligo 4 P7985
5'GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGATCGTGAGGGT GAAATCAGTACCACTACCG3' (SEQ ID NO:55)

oligo 5 P7986:
5'ATTTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCGGT CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEQ ID NO:56)

Fwd P7981:
5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAAGCC3' (SEQ ID NO:57)

Bwd P7980

5'GAATTCCGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT3' (SEQ ID NO:58),

A PCR reaction, 100 µl, was set up containing, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 2 pmoles of P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 pmoles of P7980, P7981 and 1 unit of Taq polymerase. Reactions were cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, each reaction was analysed by electrophoresis on an agarose gel and the PCR fragment excised from the gel and recovered using a Mermaid Kit. The recovered fragment was restricted with the enzymes BstEII and SpII in the appropriate buffer. The resulting product was finally electrophoresed on an agarose gel and the 270 base pair DNA fragment recovered from a gel slice and ligated into vector CTIL5-gL6 (Figure 12), that had previously been digested with the same enzymes. The above vector provides the missing antibody leader sequence and the first 17 amino acids of framework 1.

The ligation mixture was used to transform E. coli strain LM1035 and resulting colonies analysed by PCR, restriction enzyme digests and nucleotide sequencing. The nucleotide and amino acid sequence of the Vl region of hTNF40-gL1 is shown in Figure 8 (SEQ ID NO:8).

Construction of CDR-Grafted Light Chain hTNF40-gL2.

hTNF40-gL2 (SEQ ID NO:9) was constructed using PCR. The following oligonucleotides were used to introduce the amino acid changes:

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

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

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

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

Two reactions, each 20 µl, were set up each containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 0.1 µg hTNF40-gL1, 6 pmoles of R1053/R5350 or R5349/R684 and 0.25 units Taq polymerase. Reactions were cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, each reaction was analysed by electrophoresis on an agarose gel and the PCR fragments excised from the gel and recovered using a Mermaid Kit.

Aliquots of these were then subjected to a second round of PCR. The reaction, 100 µl, contained 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 1/5 of each of the PCR fragments from the first set of reactions, 30 pmoles of R1053 and R684 and 2.5 units Taq polymerase. Reaction temperatures were as above. After the PCR, the mixture was extracted with phenol/chloroform and then with chloroform and precipitated with ethanol. The ethanol precipitate was recovered by centrifugation, dissolved in the appropriate buffer and restricted with the enzymes BstEII and SplI. The resulting product was finally electrophoresed on an agarose gel and the 270 base pair DNA fragment recovered from a gel slice and ligated into the vector pMR15.1 (Figure 4) that had previously been digested with the same enzymes.

The ligation mixture was used to transform E. coli LM1035 and resulting colonies analysed by PCR, restriction enzyme digests and nucleotide sequencing. The nucleotide and amino acid sequence of the Vl region of hTNF40-glL2 is shown in Figure 9 (SEQ ID NO:9).

CDR-Grafting of hTNF40 Heavy Chain

CDR-grafting of hTNF40 heavy chain was accomplished using the same strategy as described for the light chain. hTNF40 heavy chain was found to be most homologous to human heavy chains belonging to subgroup 1 and therefore the consensus sequence of the human subgroup 1 frameworks was chosen to accept the hTNF40 heavy chain CDRs.

To investigate the requirement of a homologous human framework to act as an acceptor framework for CDR grafting, a second framework, human group 3, was selected to humanise hTNF40 heavy chain.

A comparison of hTNF40 with the two different frameworks region is shown in Figure 2 where it can be seen that hTNF40 differs from the human subgroup 1 consensus at 32 positions (underlined) and differs from the human subgroup 3 consensus at 40 positions

(underlined). After analysis of the contribution that any of these might make to antigen binding, residues 28, 38, 46, 67, 69 and 71 were retained as donor in the CDR-grafted heavy chain gh1hTNF40.1, using the group 1 framework. Residues 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 and 78 were retained as donor in the CDR-grafted heavy chain, gh3hTNF40.4 using the group 3 framework. Residues 28, 69 and 71 were retained as donor in the CDR-grafted heavy chain, gh1hTNF40.4 using the group 1 framework.

Construction of CDR-Grafted Heavy Chain gh1hTNF40.4

gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO:10) was assembled by subjecting overlapping oligonucleotides to PCR in the presence of the appropriate primers. The following oligonucleotides were used in the PCR:

Group 1 graft

oligo 1 P7989:
5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:63)

oligo 2 P7990:
5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC GTGTTCACAGACTATGGTA3' (SEQ ID NO:64)

oligo 3 P7991:
5'CCAACCCATCCATTTCAGGCCTTGTCCCGGGGCCTGCTTGACCCAATTCATAC CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEQ ID NO:65)

oligo 4 P7995:
5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEQ ID NO:66)

oligo 5 P7992:
5'CCATGTATGCAGTGCGTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTT GAA3' (SEQ ID NO:67)

oligo 6 P7993:
5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCGC AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:68)

oligo 7 P7994:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO:69)

Fwd: P7988:
5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:70)

Bwd P7987:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

The assembly reaction, 100 µl, contained 10 mM Tris-HC1 pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KC1, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 2 pmole of each of p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 and p7994, 10 pmoles of each of p7988 and p7987 and 1 unit Taq polymerase. Reactions were cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, the reaction was extracted with phenol/chloroform (1/1), then with chloroform and precipitated with ethanol. After centrifugation, the DNA was dissolved in the appropriate restriction buffer and digested with ApaLI and KpnI. The resulting fragment was isolated from an agarose gel and ligated into pMR14 (Figure 5) that had previously been digested with the same enzymes. pMR14 contains the human gamma 4 heavy chain constant region when pMR14 is cleaved with ApaLI and KpnI, the cleaved vector is able to receive the digested DNA such that the 3' end of the digested DNA joins in reading frame to the 5' end of the sequence encoding the gamma 4 constant region. Therefore, the heavy chain expressed from this vector will be a gamma 4 isotype. The ligation mixture was used to transform *E. coli* LM1035 and resulting bacterial colonies screened by restriction digest and nucleotide sequence analysis. In this way, a plasmid was identified containing the correct sequence for gh1hTNF40.4 (Figure 10) (SEQ ID NO:10).

Construction of CDR-Grafted Heavy Chain gh3hTNF40.4

gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11) was assembled by subjecting overlapping oligonucleotides to PCR in the presence of the appropriate primers. The following oligonucleotides were used in the PCR:

Group 3 graft

oligo 1 P7999:
5'GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCTGAACCTCAG AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:72)

oligo 2 P8000:
5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCTGGTTACG TCTTCACAGACTATGGAA3' (SEQ ID NO:73)

oligo 3 P8001
5'CCAACCCATCCATTTCAGGCCCTTTCCCGGGGCCTGCTTAACCCAATTCATTC CATAGTCTGTGAAGACGT3' (SEQ ID NO:74)

oligo 4 P7995:
5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEQ ID NO:66)

oligo 5 P7997:
5'GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGAATCTGCCCTT GAA3' (SEQ ID NO:75)

oligo 6 P7998:
5'CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:76)

oligo 7 P7993:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO:77)

Fwd P7996:
5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:78)

Bwd P7987:
5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

The assembly reaction, 100 µl, contained 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 2 pmole of each of p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 and p7993, 10 pmoles of each of p7996 and p7987 and 1 unit Taq polymerase. Reactions were cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, the reaction was extracted with phenol/chloroform (1/1), then with chloroform and precipitated with ethanol. After centrifugation, the DNA was dissolved in the appropriate restriction buffer and digested with ApaLI and KpnI. The resulting fragment was isolated from an agarose gel and ligated into pMR14 (Figure 5) that had previously been digested with the same enzymes. pMR14 contained the human gamma 4 heavy chain constant region. When pMR14 is cleaved with ApaLI and KpnI, the cleaved vector is able to receive the digested DNA such that the 3' end of the digested DNA joins in reading frame to the 5' end of the sequence encoding the gamma 4 constant region. Therefore, the heavy chain expressed from this vector will be a gamma 4 isotype. The ligation mixture was used to transform *E. coli* LM1035 and resulting bacterial colonies screened by restriction digestion and nucleotide sequence analysis. In this way, a plasmid was identified containing the correct sequence for gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11) (Figure 11).

Production of CDR-Grafted Modified Fab Fragment.

A CDR-grafted, modified Fab fragment, based on antibody hTNF40, was constructed using the *E. coli* vector pTTO-1. The variable regions of antibody hTNF40 are sub-cloned into this vector and the intergenic sequence optimised to create pTTO(CDP870). The pTTO expression vector is designed to give rise to soluble,

periplasmic accumulation of recombinant proteins in *E. coli*. The main features of this plasmid are:

(i) tetracycline resistance marker - antibiotic not inactivated by the product of resistance gene, hence selection for plasmid-containing cells is maintained;

(ii) low copy number - origin of replication derived from plasmid p15A, which is compatible with plasmids containing colE1 derived replicons;

(iii) strong, inducible tac promoter for trancription of cloned gene(s);

(iv) $lacI^q$ gene - gives constitutive expression of the lac repressor protein, maintaining the tac promoter in the repressed state until induction with IPTG / allolactose;

(v) OmpA signal sequence - gives periplasmic secretion of cloned gene(s); and

(vi) translational coupling of OmpA signal sequence to a short lacZ peptide, giving efficient initiation of translation.

The vector has been developed for expression of modified Fab fragments from a dicistronic message by the design of a method to select empirically the optimum intergenic sequence from a series of four purpose-built cassettes. The application of this in the construction of pTTO(CDP870) is described.

Materials and Methods

DNA techniques

Standard procedures were used for protocols including DNA restriction, agarose gel electrophoresis, ligation and transformation. Restriction enzymes and DNA modifying enzymes were obtained from New England Biolabs or Boehringer Mannheim, and were used according to the supplier's recommendations. DNA fragments were purified from agarose using the GeneClean protocol (BIO 101). Oligonucleotides were supplied by Oswel Oligonucleotide Service and were synthesized at the 40 nm scale. Plasmid DNA was isolated using Plasmid DNA Mini / Midi kits from Qiagen. PCR was performed using Perkin Elmer 'Amplitaq' as recommended. DNA sequencing was performed using the Applied Biosystems Taq cycle sequencing kit.

Shake flask induction

E. coli W3110 cultures were grown in L-broth supplemented with tetracycline (7.5 µg/ml). For inductions, fresh overnight cultures (grown at 30-C) were diluted to OD_{600} of

0.1 into 200 ml L-broth in a 2 L baffled flask and were grown at 30°C in an orbital incubator. At OD_{600} of 0.5, IPTG was added to 200 μM. Samples (normalised for OD) were taken at intervals.

Periplasmic Extraction

Culture samples were chilled on ice (5 minutes) then cells were harvested by centrifugation. Following resuspension in extraction buffer (100 mM Tris.HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4) samples were incubated overnight at 30°C, then clarified by centrifugation.

Assembly Assay

Modified Fab concentrations were determined by ELISA. Plates were coated at 4°C overnight with anti-human Fd 6045 (2 μg/ml in coating buffer, physiological saline, 100 μl per well). After washing, 100 μl of sample was loaded per well; purified A5B7 gamma-1 Fab', initially at 2 μg/ml, was used as a standard. Samples were serially diluted 2-fold across the plate in sample conjugate buffer (per litre: 6.05 g trisaminomethane; 2.92 g NaCl; 0.1 ml Tween-20; 1 ml casein (0.2%)); plates were incubated for 1 hour at room temperature, with agitation. Plates were washed and dried, then 100 μl of anti-human C-kappa (GD12)-peroxidase was added (diluted in sample conjugate buffer). Incubation was carried out at room temperature for 1 hour with agitation. Plates were washed and dried, then 100 μl of substrate solution was added (10 ml sodium acetate/citrate solution (0.1 M pH 6); 100 μl H_2O_2 solution; 100 μl tetramethylbenzidine solution (10 mg/ml in dimethylsulphoxide)). Absorbance at 630 nm was read 4 - 6 minutes after substrate addition.

Construction of Plasmid pTTQ-1

(a) Replacement of the pTTQ9 Polylinker

Plasmid pTTQ9 was obtained from Amersham and is shown in Figure 14. An aliquot (2 μg) was digested with restriction enzymes SalI and EcoRI, the digest was run on a 1% agarose gel and the large DNA fragment (4520 bp) was purified. Two oligonucleotides were synthesized which, when annealed together, encode the OmpA polylinker region shown in Figure 15. This sequence has cohesive ends which are compatible with the SalI and EcoRI ends generated by restriction of pTTQ9. By cloning this oligonucleotide 'cassette' into the pTTQ9 vector, the SalI site is not regenerated, but the

EcoRI site is maintained. The cassette encodes the first 13 amino acids of the signal sequence of the *E. coli* outer-membrane protein Omp-A, preceded by the Shine Dalgarno ribosome binding site of the OmpA gene. In addition restriction sites for enzymes XbaI, MunI, StyI and SplI are present. The MunI and StyI sites are within the coding region of the OmpA signal sequence and are intended as the 5' cloning sites for insertion of genes. The two oligonucleotides which make up this cassette were annealed together by mixing at a concentration of 5 pmoles/µl and heating in a waterbath to 95°C for 3 minutes, then slow cooling to room temperature. The annealed sequence was then ligated into the SalI / EcoRI cut pTTQ9. The resulting plasmid intermediate, termed pTQOmp, was verified by DNA sequencing.

(b) Fragment Preparation and Ligation

Plasmid pTTO-1 was constructed by ligating one DNA fragment from plasmid pACYC184 to two fragments generated from pTQOmp. Plasmid pACYC184 was obtained from New England Biolabs, and a restriction map is shown in Figure 16. An aliquot (2 µg) was digested to completion with restriction enzyme StyI, then treated with Mung Bean Nuclease; this treatment creates blunt ends by cutting back 5' base overhangs. Following phenol extraction and ethanol precipitation, the DNA was restricted with enzyme PvuII, generating fragments of 2348, 1081, 412 and 403 bp. The 2348 bp fragment was purified after agarose gel electrophoresis. This fragment encodes the tetracycline resistance marker and the p15A origin of replication. The fragment was then treated with calf intestinal alkaline phosphatase to remove 5' terminal phosphates, thereby preventing the self-ligation of this molecule.

An aliquot (2 µg) of plasmid pTQOmp was digested with enzymes SspI and EcoRI, and the 2350 bp fragment was purified from unwanted fragments of 2040 bp and 170 bp following agarose gel electrophoresis; this fragment encodes the transcriptional terminator region and the $lacI^q$ gene. Another aliquot (2 µg) of pTQOmp was digested with EcoRI and XmnI, generating fragments of 2289, 1670, 350 and 250 bp. The 350 bp fragment, encoding the tac promoter, OmpA signal sequence and multicloning site, was gel purified.

The three fragments were then ligated, using approximately equimolar amounts of each fragment, to generate the plasmid pTTO-1. All cloning junctions were verified by DNA sequencing. The restriction map of this plasmid is shown in Figure 17. Plasmid pTTO-2 was then created by insertion of DNA encoding the human Ig light chain kappa constant domain. This was obtained as a SpI I – EcoRI restriction fragment from plasmid

pHC132, and inserted into the corresponding sites in pTTO-1. Plasmid pTTO-2 is shown in Figure 18.

Insertion of humanized hTNF40 variable regions into pTTO-2

The variable light chain region hTNF40gL1 (SEQ ID NO:8) was obtained by PCR 'rescue' from the corresponding vector for mammalian cell expression pMR10.1. The OmpA leader sequence replaces the native Ig leader. The sequence of the PCR primers is shown below:

5' primer:

CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAG CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEQ ID NO:79)

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

Following PCR under standard conditions, the product was purified, digested with enzymes MunI and SpII then gel purified. The purified fragment was then inserted into the MunI / SpII sites of pTTO-2 to create the light chain intermediate pTTO(hTNF40L).

The variable heavy chain region of gh3hTNF40.4 was obtained in the same way from the vector pGamma-4. The sequence of the PCR primers is shown below:

5' primer:

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG CTGAGGTTCAGCTGGTCGAGTCAGGAGGC (SEQ ID NO:81)

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

Following PCR the product was purified, digested with enzymes NheI and ApaI then sub-cloned into the vector pDNAbEng-G1 (Figure 19). After verification by DNA sequencing, the heavy chain was restricted with enzyme EcoRI and sub-cloned into the EcoRI site of pTTO(hTNF40L) to create the *E. coli* expression plasmid pTTO(hTNF40).

Optimisation of Intergenic Sequence for Modified Fab Expression

In the pTTO vector, modified Fab expression occurs from a dicistronic message encoding first light chain then heavy chain. The DNA sequence between the two genes (intergenic sequence, IGS) can influence the level of expression of the heavy chain by affecting the rate of translational initiation. For example, a short intergenic sequence may result in translational coupling between the light and heavy chains, in that the translating ribosome may not fully dissociate from the mRNA after completing light chain synthesis before initiating heavy chain synthesis. The 'strength' of any Shine Dalgarno (SD) ribosome binding site (homolgy to 16S rRNA) can also have an effect, as can the distance and sequence composition between the SD and the ATG start codon. The potential secondary structure of mRNA around the ATG is another important factor; the ATG should be in a 'loop' and not constrained within a 'stem', while the reverse applies to the SD. Thus by modifying the composition and length of the IGS it is possible to modify the strength of translational initiation and therefore the level of heavy chain production. It is likely that an optimum rate of translational initiation needs to be achieved to maximise expression of the heavy chain of a given modified Fab. For example, with one modified Fab, a high level of expression may be tolerated, but for a different modified Fab with different amino acid sequence, a high level of expression might prove toxic, perhaps because of different efficiencies of secretion or folding. For this reason, a series of four intergenic sequences were designed (Figure 20), permitting the empirical determination of the optimum IGS for the hTNF40-based modified Fab. IGS1 and IGS2 have very short intergenic sequences (-1 and +1 respectively) and might be expected to give closely coupled translation; the SD sequences (underlined) are subtly different. These two sequences will most likely confer a high level of translational initiation. IGS3 and IGS4 have a longer distance between start and stop codons (+13) and differ in their sequence composition; IGS3 has a 'stronger' SD sequence. All sequences were studied for secondary structure (using m/fold program) and 'optimised' as far as possible; however, with tight coupling of translation of the two chains the lack of ribosomal dissociation means that the mRNA may not be 'naked', preventing secondary structure formation.

Cloning of IGS variants

The IGS cassettes shown in Figure 20 have flanking SacI and MunI cloning sites. They were built by annealing complementary oligonucleotide pairs. A vector fragment was prepared by digesting pTTO(hTNF40) with SacI and NotI, and a heavy chain fragment was

prepared by digesting pDNAbEngG1(hTNF40H) with MunI and NotL. Three-way ligations were then performed, using equimolar amounts of the two restriction fragments and approximately 0.05 pmoles of each annealed oligo cassette. This created the four expression plasmids pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS-4).

Shake flask expression analysis

The four plasmids were transformed into *E. coli* strain W3110, along with the original expression construct, and then analysed for expression in shake flasks as described. The results of a typical experiment are shown in Figure 21. The different intergenic sequences confer different expression profiles. IGS1 and IGS2 accumulate periplasmic modified Fab rapidly with a peak at 1 hour post induction, after which the level recovered falls. The peak is greater and the fall sharper for IGS1. These results are consistent with a high level of synthesis, as expected for close translational coupling for these constructs. IGS1 apparently confers a higher level of heavy chain expression than does IGS2. In this instance, it appears that this high level of expression is poorly tolerated, since periplasmic expression levels fall after the 1 hour peak. This is seen on the growth profile of the IGS1 culture (not shown), which peaks at 1 hour post induction before falling, suggesting cell death and lysis. IGS3 accumulates modified Fab more slowly but peaks at 2 hours post induction with a higher peak value (325 ng/ml/OD), before levels fall. The growth of this culture continued to 3 hours post induction and reached a higher peak biomass (not shown). This is consistent with a lower level of heavy chain synthesis. IGS4 accumulates material at a slower rate still and fails to reach the high peak of productivity of the other 3 constructs. All IGS variants out-perform the original vector significantly. The hypothesis that the different IGS sequences confer different rates of translational initiation is supported by these experimental results. For the hTNF40-based modified Fab it appears that a high rate of heavy chain translational initiation is poorly tolerated and is therefore not optimal. A slower rate, as conferred by IGS3, results in better growth characteristics and consequently a better yield accumulates over time.

Following comparison of productivity in the fermenter the IGS3 construct was selected as the highest yielding and was termed pTTO(CDP870) – see Figure 22.

The heavy chain encoded by the plasmid pTTO(CDP870) has the sequence given in SEQ ID NO:115 and the light chain has the sequence given in SEQ ID NO:113.

215
214

PEGylation of CDR-Grafted, hTNF40-based Modified Fab.

The purified modified Fab is site-specifically conjugated with a branched molecule of PEG. This is achieved by activation of a single cysteine residue in a truncated hinge region of the modified Fab, followed by reaction with (PEG)-lysyl maleimide as previously described (A.P. Chapman *et al.*, Nature Biotechnology 17, 780-783; 1999). The PEGylated molecule is shown in Figure 13 and is called compound CDP870.

Efficacy of PEGylated CDR-Grafted, hTNF40-based Modified Fab (CDP870) in Treating Rheumatoid Arthritis.

CDP870 has a long half life of approximately 11 days.

We evaluated the safety and efficacy of intravenous CDP870 in a randomised double-blind placebo-controlled dose escalating trial in patients with RA.

Methods

Patients:

Patients aged between 18 and 75 years old and who satisfied the 1987 revised American College of Rheumatology (ACR) diagnostic criteria for rheumatoid arthritis (RA) (Arnett *et al.*, Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988) were recruited from outpatient Rheumatology clinics at London, Cambridge, Norfolk and Norwich (United Kingdom). Patients were required to have clinically active disease as defined by having at least 3 of the following criteria: $\geq$ 6 painful or tender joints; $\geq$ 45 minutes of early morning stiffness; and erythrocyte sedimentation rate (ESR) $\geq$ 28 mm/hr. They must have failed to respond to at least one Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug (DRARD) and have been off treatment for at least 4 weeks. Corticosteroids were permitted if the dose was $\geq$ 7.5 mg/day of prednisolone. Pregnant women, nursing women and women of childbearing potential not using an effective method of contraception were excluded. Patients were also excluded if they had a previous history of malignancy, concomitant severe uncontrolled medical conditions, previous failure of TNFα-neutralizing therapy or allergy to polyethylene glycol. Written informed consent was obtained from each patient before enrolment. The study was approved by the local research ethics committees.

Treatment protocol:

36 RA patients were divided into 3 groups, each to receive an increasing dose of the trial drug (1, 5 or 20mg/kg). Each group of 12 was randomly divided into 8 to receive CDP870 and 4 to receive placebo. CDP870 was given as a single intravenous infusion (100 ml in total) over 60 minutes. Placebo (sodium acetate buffer) was given similarly as a single intravenous infusion of 100 ml over 60 minutes. Treatment was given on an outpatient basis. After 8 weeks, all patients had the opportunity to receive an infusion of either 5 or 20 mg/kg of CDP870 in open fashion.

Clinical assessment:

RA disease activity was assessed based on the World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology (Boers *et al.*, J. Rheumatol – Supplement, 41, 86-89, 1994) and European League Against Rheumatism (EULAR) (Scott *et al.*, Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) core data sets with 28 joint counts. Changes in disease activity were assessed by Disease Activity Score (Prevoo *et al.*, Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) and the ACR responses criteria (Felson *et al.*, Arthritis Rheum., 38, 727-735, 1995). Assessments were carried out before treatment and at 1, 2, 4, 6 and 8 weeks after therapy. Patients were also assessed for safety and tolerance of the study drug. Haematology, biochemistry, anti-CDP870 antibodies and adverse events were assessed at each visit.

CDP870 plasma concentration and anti-CDP870 antibodies:

CDP870 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serial dilutions of patients' plasma were incubated in microtitre plates (Nunc) coated with recombinant human TNFα (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). Captured CDP870 was revealed with horseradish peroxidase conjugated goat anti-human kappa light chain (Cappel, ICN) followed by tetramethylbenzidine (TMB) substrate.

Antibodies to CDP870 was screened (at 1/10 plasma dilution) using a double antigen sandwich ELISA with biotinylated CDP870 as the second layer. Bound antibodies were revealed using HRP-streptavidin and TMB substrate. The assay was calibrated using a hyperimmune rabbit IgG standard. A unit of activity is equivalent to 1 µg of the rabbit. standard.

Statistical Analysis

The study was exploratory in nature and the sample size was based on previous experience with similar agents. Efficacy of CDP870 was analysed by calculating disease activity score (DAS) and ACR20/50 responses for intention to treat and per-protocol using a closed testing procedure. The disease activity score was calculated as follows: DAS = 0.555 x square root of (28 tender joints) + 0.284 x square root of (28 swollen joints) + 0.7 x ln(ESR) + 0.0142 x (patient's global assessment). First, the pooled active groups were compared to placebo. If this comparison was significant at the 5% level, each dosage group was compared to placebo. All comparisons were two tailed with a significance level of 5%. All P-values were derived from exploratory analysis and should not be used for inferential interpretation.

Results

Demography:

36 patients with RA were recruited. Their demographic details are given in Table 6. The mean age was 56 years and 30 patients were female. The mean duration of RA was 13 years and 21 patients were rheumatoid factor positive. Patients in the different groups have similar demographic characteristics. In the blinded dosing period, 6/12 placebo-treated patients withdrew from the study for deteriorating RA $\geq$ 4, weeks after dosing. 2/24 CDP870-treated patients withdrew, both in the 1 mg/kg group, for deteriorating RA/lost to follow up > 4 weeks after dosing. The difference was statistically significant (p=0.009, Fisher exact test).

Table 6: Demographic details (mean $\pm$ standard deviation)

	Number	Sex (M:F)	Age	Duration of Disease	Rheuma-toid Factor	Number of previous DMARDs
Placebo	12	1.11	51$\pm$8	12$\pm$8	8(67%)	5$\pm$1
1 mg/kg	8	1:7	59$\pm$7	12$\pm$7	4(50%)	4$\pm$1
5m g/kg	8	2:6	54$\pm$13	13$\pm$5	5(63%)	5$\pm$2
20 mg/kg	8	2.6	61$\pm$11	14$\pm$13	4(50%)	4$\pm$2

Clinical Efficacy:

The proportion of patients with ACR20 improvement for the per-protocol population with last observation carried forward was 16.7, 50, 87.5 and 62.5% after placebo, 1, 5 and 20 mg/kg CDP870 (combined treatment effect p=0.012) at 4 weeks and 16.7, 25, 75 and 75% (p=0.032) at 8 weeks. Reduction in DAS scores (median) for the per-protocol population with last observation carried forward was 0.15, 1.14, 1.91 and 1.95 after placebo, 1, 5 and 20 mg/kg CDP870 (combined treatment effect p=0.001) at 4 weeks and 0.31, 0.09, 2.09 and 1.76 (p=0.008) at 8 weeks (Figure 23). Changes in individual components of the World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology core data set are shown in Figure 24.

Following the open label dose of CDP870, similar beneficial effects were achieved. Of the 36 patients recruited into the study, 32 received a second infusion of CDP870. The proportion of patients with ACR20 improvement from pre-first infusion was 72.2 and 55.6% after 5 and 20 mg/kg CDP870 at 4 weeks and 55.6 and 66.7% at 8 weeks.

Adverse Events

Treatment was well tolerated with no infusion-related reaction. No allergic reaction or skin rash was reported. In the double-blind phase, there were 19, 38, 8 and 14 adverse events in the placebo, 1, 5 and 20 mg/kg groups respectively. The commonest was headache with 9 episodes in 5 patients (1 placebo, 3 at 1 mg/kg, 1 at 20 mg/kg). One patient who received placebo and 3 patients who received CDP870 (1 at 5 mg/kg and 2 at 20 mg/kg) developed lower respiratory tract infections. These were reported as mild or moderate. They were treated with oral antibiotics and resolved over 1-2 week period. Three patients each in the 1 and 5 mg/kg groups and one in the 20 mg/kg group developed a urinary tract infection 1-2 months after CDP870 treatment. One adverse event was described as severe which was an episode of neck pain occurring 3 days after infu[illegible]n with 1 mg/kg. Increase in anti-nuclear antibody was seen in 4 patients: 1 in the placebo group (negative to 1/40), 2 in the 1 mg/kg group (negative to 1/40, negative to 1/80) and 1 in the 20 mg/kg group (negative to 1/40). No change was found in anti-DNA or anti-cardiolipin antibodies.

CDP870 Plasma Concentration and Anti-CDP870 levels

As expected, for all dose levls of CDP870, the peak plasma concentration occurred at the end of infusion and was dose proportional with plasma concentration declining slowly thereafter. The plasma concentration profile of CDP870 appeared very similar to that previously observed in volunteers where the half-life was calculated to be approximately 14 days. On re-dosing, a similar profile to single dose infusion was observed.

Following a single intravenous infusion, anti-CDP870 levels were low or undetectable.

Discussion

Neutralizing TNFα is an effective treatment strategy in RA. Currently, this requires the use of biological agents, such as a chimeric mAb or a soluble receptor/human Fc fusion protein, which are expensive to manufacture. A therapeutic TNFα neutralizing agent needs to bind TNFα with high affinity and have a long plasma half-life, low antigenicity and high tolerability and safety. It also needs to be accessible to all patients with RA who would benefit from TNFα blockade. One technology that could achieve these objectives is the conjugation with polyethelene glycol of a TNFα binding antibody fragment made in *E. coli*. In this preliminary study, we find that CDP870, a PEGylated, anti-TNFα, modified Fab, is effective and well tolerated by patients with RA.

In vitro studies have shown that CDP870 has similar TNFα neutralizing activity to the murine anti-TNFα parent antibody. This study confirms that CDP870 reduced inflammation and improved symptoms in RA. Clinical improvement as measured by the ACR20 response criteria in the 5 and 20 mg/kg groups (75%, 75%) was comparable to etanercept (60%) (Moreland *et al.*, Annals Int. Med., 130, 478-486, 1999) and infliximab (50%) (Maini *et al.*, Lancet, 354, 1932-1939, 1999). At the middle and highest dosage levels tested, the therapeutic effect lasted 8 weeks which is comparable to previous other mAbs (Elliott *et al.*, Lancet, 344, 1105-1110, 1994 and Rankin *et al.*, Br. J. Rheumatol., 34, 334-342, 1995). Previous study has shown that the therapeutic effect of anti-TNFα antibody is related to its plasma half-life and the generation of circulating antibodies (Maini *et al.*, Arthritis Rheum 38, (Supplement) : S186 1995 (Abstract)). Our study showed that CDP870 has a plasma half-life of 14 days which is equivalent to that of a whole antibody

(Rankin *et al.*, (*supra*)) and much longer than the half-life of unconjugated Fab' fragments. Further, CDP870 generated only very low levels of antibody response.

One of the important objectives of this study is to examine the tolerability and safety of administering this PEGylated Fab'. In our study, CDP870 appears well tolerated. Although further study will be needed to assess long-term toxicity, especially the risk of demyelinating disease, infection and skin rashes that have been reported with etanercept and infliximab.

In summary, CDP870 is therapeutically effective in RA and was well tolerated in this short-term study.

It should be understood that the above-described examples are merely exemplary and do not limit the scope of the present invention as defined in the following claims.

CLAIMS

1. An antibody molecule having specificity for human TNFα, comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given as H1 in Figure 3 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2' in Figure 3 (SEQ ID NO:2) or as H2' in Figure 3 (SEQ ID NO:7) for CDRH2 or as H3 in Figure 3 (SEQ ID NO:3) for CDRH3.

2. An antibody molecule having specificity for human TNFα, comprising a light chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given as L1 in Figure 3 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, as L2 in Figure 3 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or as L3 in Figure 3 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

3. The antibody molecule of claim 1 or claim 2 comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given in SEQ ID NO:1 for CDRH1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:7, for CDRH2 or SEQ ID NO:3 for CDRH3 and a light chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given in SEQ ID NO:4 for CDRL1, SEQ ID NO:5 for CDRL2 or SEQ ID NO:6 for CDRL3.

4. The antibody molecule of claim 3, which comprises SEQ ID NO:1 for CDRH1, SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO:7 for CDRH2, SEQ ID NO:3 for CDRH3, SEQ ID NO:4 for CDRL1, SEQ ID NO:5 for CDRL2 and SEQ ID NO:6 for CDRL3.

5. The antibody molecule of any one of claims 1 to 4, which comprises SEQ ID NO:2 for CDRH2.

6. The antibody molecule of any one of claims 1 to 5, which is a CDR-grafted antibody molecule.

7. The antibody molecule of claim 6, wherein the variable domain comprises human acceptor framework regions and non-human donor CDRs.

8. The antibody molecule of claim 7, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the heavy chain are based on a human group 1 consensus sequence and comprise non-human donor residues at positions 28, 69 and 71

9. The antibody molecule of claim 7, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the heavy chain are based on a human group 1 consensus sequence and comprise non-human donor residues at positions 28, 38, 46, 67, 69 and 71.

10. The antibody molecule of claim 7, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the heavy chain are based on a human group 3 consensus sequence and comprise non-human donor residues at positions 27, 28, 30, 48 49, 69, 71, 73 76 and 78.

11. The antibody molecule of any one of claims 7 to 10, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the light chain are based on human group 1 consensus sequence and comprise non-human donor residues at positions 46 and 60.

12. The antibody molecule of any one of claims 1 to 11, comprising the light chain variable region hTNF40-gL1 (SEQ ID NO:8) and the heavy chain variable region gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO:11).

13. The antibody molecule of any one of claims 1 to 12 which is a Fab fragment.

14. The antibody molecule of claims 12 and 13, which is a Fab fragment comprising a heavy chain having the sequence given in SEQ ID NO:111 and a light chain having the sequence given in SEQ ID NO:113.

15. The antibody molecule of any one of claims 1 to 12, which is a modified Fab fragment having at the C-terminal end of its heavy chain one or more amino acids to allow attachment of an effector or reporter molecule.

16. The antibody molecule of claim 15, wherein the additional amino acids form a modified hinge region containing one or two cysteine residues to which the effector or reporter molecule may be attached.

17. The antibody molecule of claim 12, which is a modified Fab fragment comprising a heavy chain having the sequence given in SEQ ID NO:115 and a light chain having the sequence given in SEQ ID NO:113.

18. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:113.

19. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:113.

20. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:115.

21. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:115.

22. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:115.

23. An antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:115.

24. A variant of the antibody molecule of any one of claims 1 to 23, which has an improved affinity for TNFα.

25. The variant of claim 24 which is obtained by an affinity maturation protocol.

26. The antibody of any one of claims 1 to 3 which is murine anti-TNFα monoclonal antibody hTNF40.

27. The antibody molecule of any one of claims 1 to 3, which is a chimeric antibody molecule comprising the light and heavy chain variable domains of the monoclonal antibody of claim 26.

28. A compound comprising the antibody molecule of any one of claims 15 to 23 having covalently attached to an amino acid at or towards the C-terminal end of its heavy chain an effector or reporter molecule.

29. The compound of claim 28, which comprises an effector molecule.

30. The compound of claim 29, wherein the effector molecule comprises one or more polymers.

31. The compound of claim 30, wherein the one or more polymers is/are an optionally substituted straight or branched chain polyalkylene, polyalkenylene or polyoxyalkylene polymer or a branched or unbranched polysaccharide.

32. The compound of claim 31, wherein the one or more polymers is/are a methoxypoly(ethyleneglycol).

33. A compound comprising the antibody molecule of claim 17 having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

34. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain one or more synthetic or naturally-occurring polymers.

35. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain one or more synthetic or naturally-occurring polymers.

36. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:113, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da..

37. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:113, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

38. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

39. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxy poly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

40. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain

comprising the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

41. A compound comprising an antibody molecule having specificity for human TNFα, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:113 and a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:115, having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide group wherein each amino group of the lysyl residue has covalently linked to it a methoxypoly(ethyleneglycol) residue having a molecular weight of about 20,000 Da.

42. An antibody molecule comprising a hybrid CDR comprising a truncated donor CDR sequence wherein the missing portion of the donor CDR is replaced by a different sequence and forms a functional CDR.

43. The antibody molecule of claim 42, wherein the missing part of the CDR sequence is from the antibody from which the framework regions of the antibody molecule are derived.

44. The antibody molecule of claim 43, wherein the missing part of the CDR sequence is derived from a germline antibody having consensus framework regions.

45. The antibody molecule of any one of claims 42 to 44, wherein CDRH2 of the heavy chain is hybrid in the antibody molecule.

46. The antibody molecule of any one of claims 42 to 45, wherein the truncation of the donor CDR is from 1 to 8 amino acids.

47. The antibody molecule of claim 46, wherein the truncation is from 4 to 6 amino acids.

48. The antibody molecule of any one of claims 42 to 47, wherein the truncation is made at the C-terminus of the CDR.

49. A DNA sequence which encodes the heavy and/or light chain of the antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48.

50. The DNA sequence of claim 49 comprising the sequence shown in SEQ ID NO:8 or 10.

51. The DNA sequence of claim 49 comprising the sequence shown in SEQ ID NO:10 or 11.

52. The DNA sequence of claim 49 comprising the sequence shown in SEQ ID NO:110, 112 or 114.

53. A cloning or expression vector containing the DNA sequence of any one of claims 49 to 52.

54. An *E. coli* expression vector comprising the DNA sequence of any one of claims 49 to 52.

55. The *E. coli* expression vector of claim 54 which is pTTO(CDP870).

56. A host cell transformed with the vector of any one of claims 53 to 55.

57. A process for the production of the antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48, comprising culturing the host cell of claim 56 and isolating the antibody molecule.

58. A process for the production of the antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48, comprising culturing *E. coli* comprising an *E. coli* expression vector comprising the DNA sequence of any one of claims 53 to 55 and isolating the antibody molecule.

59. The process of claim 58 wherein the antibody molecule is targeted to the periplasm.

60. A therapeutic or diagnostic composition comprising the antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48 or the compound of any one of claims 28 to 41.

61. The antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48, having specificity for human TNFα, or the compound of any one of claims 28 to 41, for use in treating a pathology mediated by TNFα.

62. The antibody molecule of or compound claim 61, for use in treating rheumatoid- or osteo- arthritis.

63. Use of the antibody molecule of any one of claims 1 to 27 and 42 to 48, having specificity for human TNFα, or the compound of any one of claims 28 to 41 in the manufacture of a medicament for the treatment of a pathology mediated by TNFα.

64. The use of claim 63, wherein the pathology is rheumatoid- or osteo- arthritis.

65. The vector pDNAbEng-G1 as shown in Figure 19.

66. The vector pTTO(CDP870) as shown in Figure 22.

67. A polypeptide having the amino acid sequence given in any one of SEQ ID NOS:1 to 7.

FIG. 1

Comparisons of framework regions of light chain of antibody hTNF40 and human group 1 consensus sequences

Hu group 1 consensus : DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 83)
hTNF40 : DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO: 84)

Hu Group 1 consensus : WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)
hTNF40 : WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO: 86)

Hu Group 1 consensus : GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)
hTNF40 : GVPYRFTGSGSGTDFTLTISTVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO: 88)

Hu Group 1 consensus : FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 89)
hTNF40 : FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 90)

FIG. 3 Sequence of CDRs of hTNF40

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2'WINTYIGEPIYADSVKG (SEQ ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

FIG. 2

Comparisons of framework regions of heavy chain of antibody hTNF40 and human group 1 and group 3 consensus sequences

Hu Group 1 consensus	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	(SEQ ID NO: 91)
hTNF40	: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
Hu Group 1 consensus	: WVRQAPGQGLEWMG	(SEQ ID NO: 93)
hTNF40	: WVKQAPGKAFKWMG	(SEQ ID NO: 94)
Hu Group 1 consensus	:RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 95)
hTNF40	:RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu Group 1 consensus	: WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 97)
hTNF40	: WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO: 98)
Hu Group 3 consensus	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 106)
hTNF40	: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
Hu Group 3 consensus	: WVRQAPGKGLEWVS	(SEQ ID NO: 107)
hTNF40	: WVKQAPGKAFKWMG	(SEQ ID NO: 94)
Hu Group 3 consensus	:RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 108)
hTNF40	:RFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu Group 3 consensus	: WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 109)
hTNF40	: WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO: 98)

FIG. 4

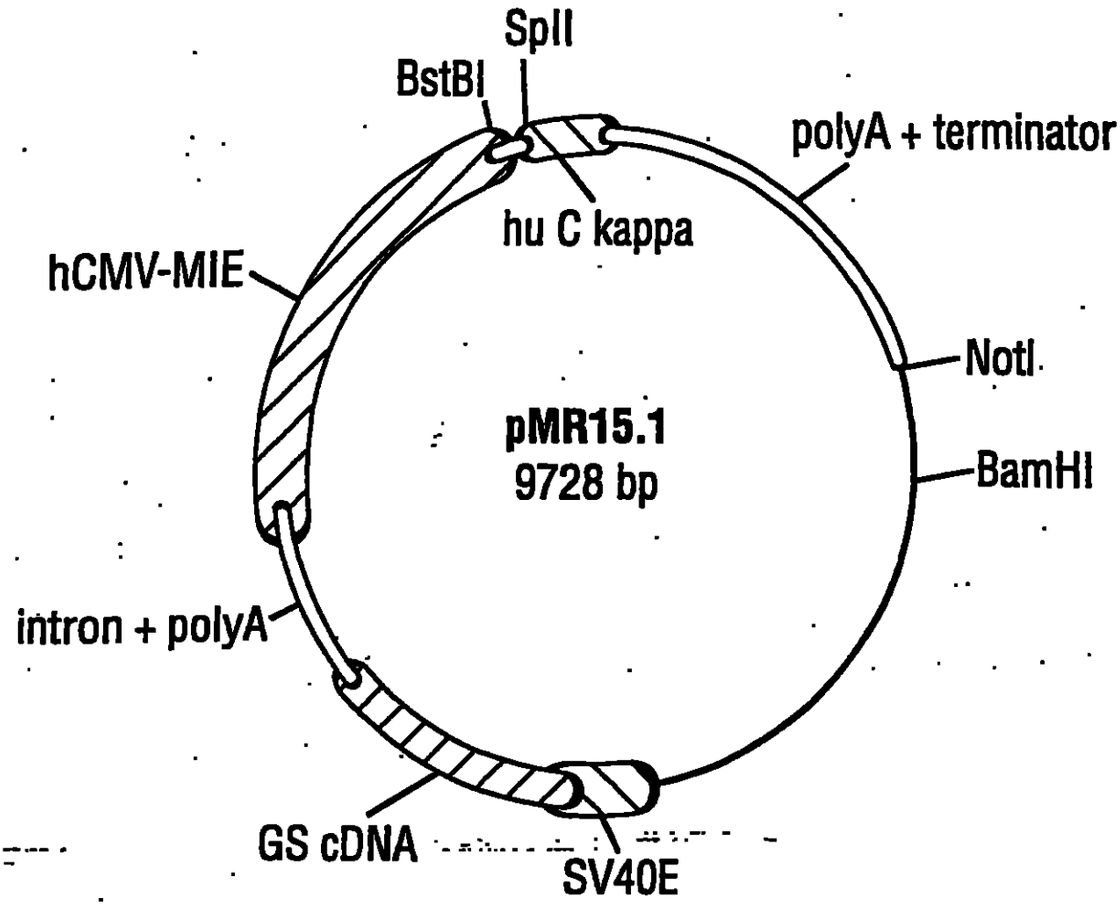

SpII
BstBI
polyA + terminator
hu C kappa
hCMV-MIE
NotI
pMR15.1
9728 bp
BamHI
intron + polyA
GS cDNA
SV40E

FIG. 5

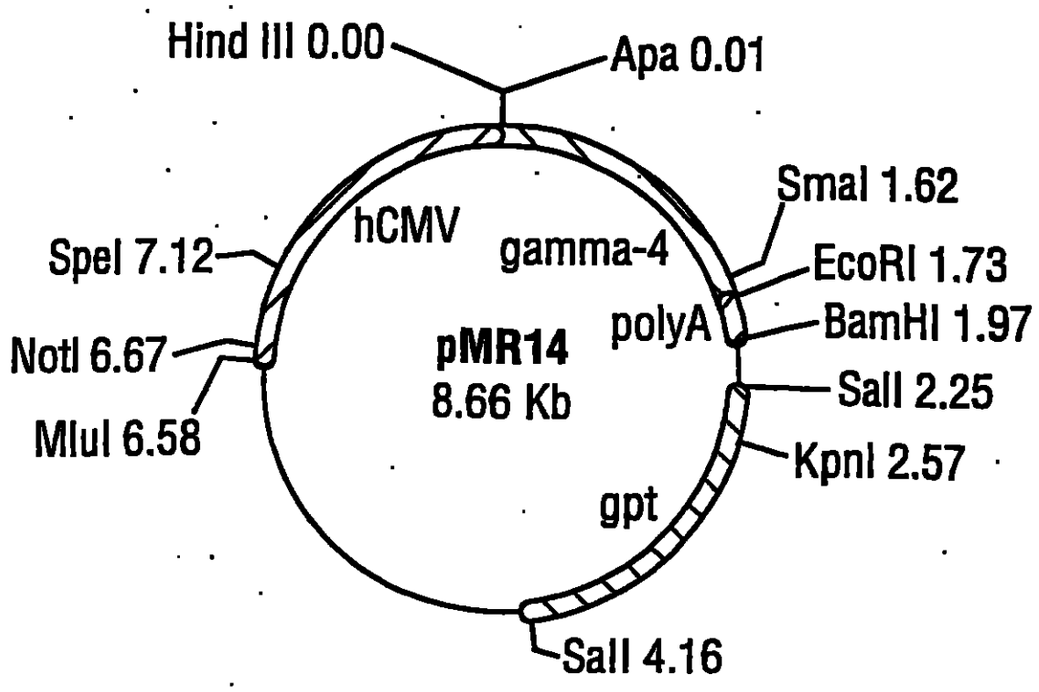

Hind III 0.00
Apa 0.01
SmaI 1.62
hCMV
gamma-4
SpeI 7.12
EcoRI 1.73
polyA
BamHI 1.97
NotI 6.67
pMR14
8.66 Kb
SalI 2.25
MluI 6.58
KpnI 2.57
gpt
SalI 4.16

FIG. 6 Murine VI Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 99)

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

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

110                 120                 130                 140                 150                 160
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA
GTT GTC TTT GGT CCT GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT
 Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   F   L>

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

  220                 230                 240                 250                 260                 270
CTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA
GAG TGG TAG TCG TGA CAC GTC AGA CTT CTG AAC CGT CTC ATA AAG ACA GTC GTT
 L   T   I   S   T   V   Q   S   E   D   L   A   E   Y   F   C   Q   Q>

            280                 290                 300                 310                 320
TAT AAC ATC TAT CCT CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT
ATA TTG TAG ATA GGA GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CTC GAC TTT GCA
 Y   N   I   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>
```

FIG. 7 Murine Vh Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 100)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 8 Grafted VI Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 8)

```
                10                  20                  30                  40                  50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

      60                  70                  80                  90                 100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
 V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

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

FIG. 9 Grafted VI sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 9)

```
          10          20          30          40          50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

     60          70          80          90          100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
 V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

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

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

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

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

FIG. 10 Grafted Vh sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 10)

```
     10          20          30          40          50
CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GCT TCC GTC
GTC CAC GTC GAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA CGA AGG CAG
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V>

     60          70          80          90          100
AAA GTT TCG TGT AAG GCC TCA GGC TAC GTG TTC ACA GAC TAT GGT ATG AAT TGG
TTT CAA AGC ACA TTC CGG AGT CCG ATG CAC AAG TGT CTG ATA CCA TAC TTA ACC
 K  V  S  C  K  A  S  G  Y  V  F  T  D  Y  G  M  N  W>

110         120         130         140         150         160
GTC AGA CAG GCC CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
CAG TCT GTC CGG GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA 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>
```

FIG. 11 Grafted Vh Sequence of hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 12

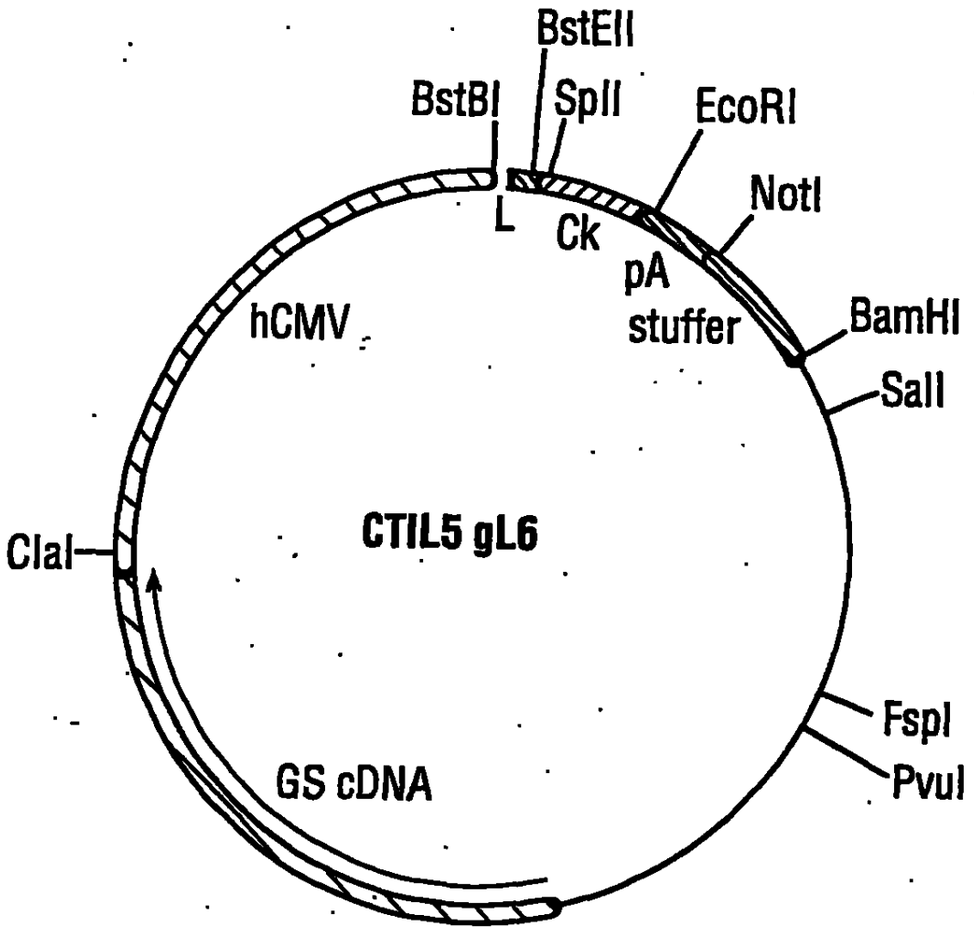

BstEII
BstBI
SpII
EcoRI
NotI
L
Ck
pA
stuffer
hCMV
BamHI
SalI
CTIL5 gL6
ClaI
FspI
PvuI
GS cDNA

FIG. 13

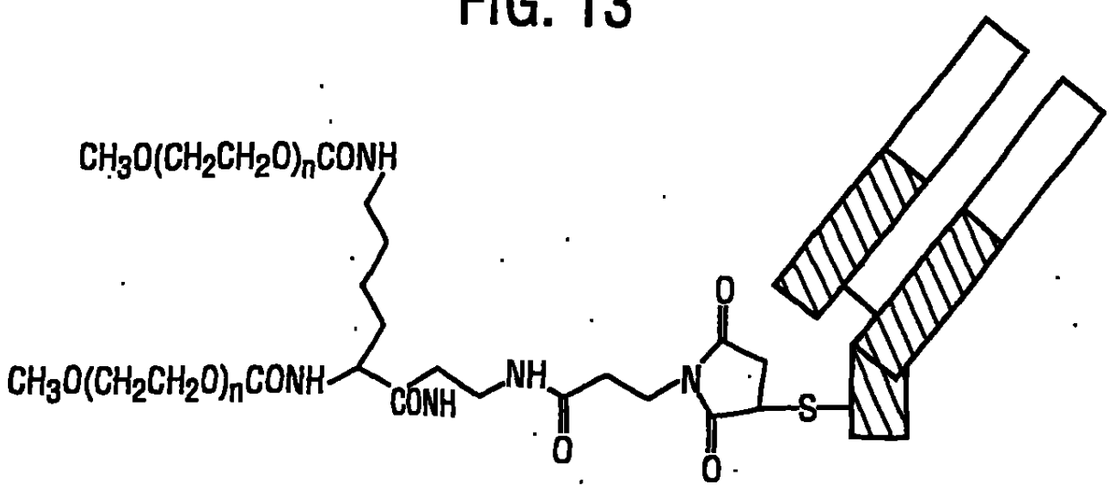

CH3O(CH2CH2O)nCONH
CH3O(CH2CH2O)nCONH
CONH
NH
O
N
O
O
S

FIG. 14

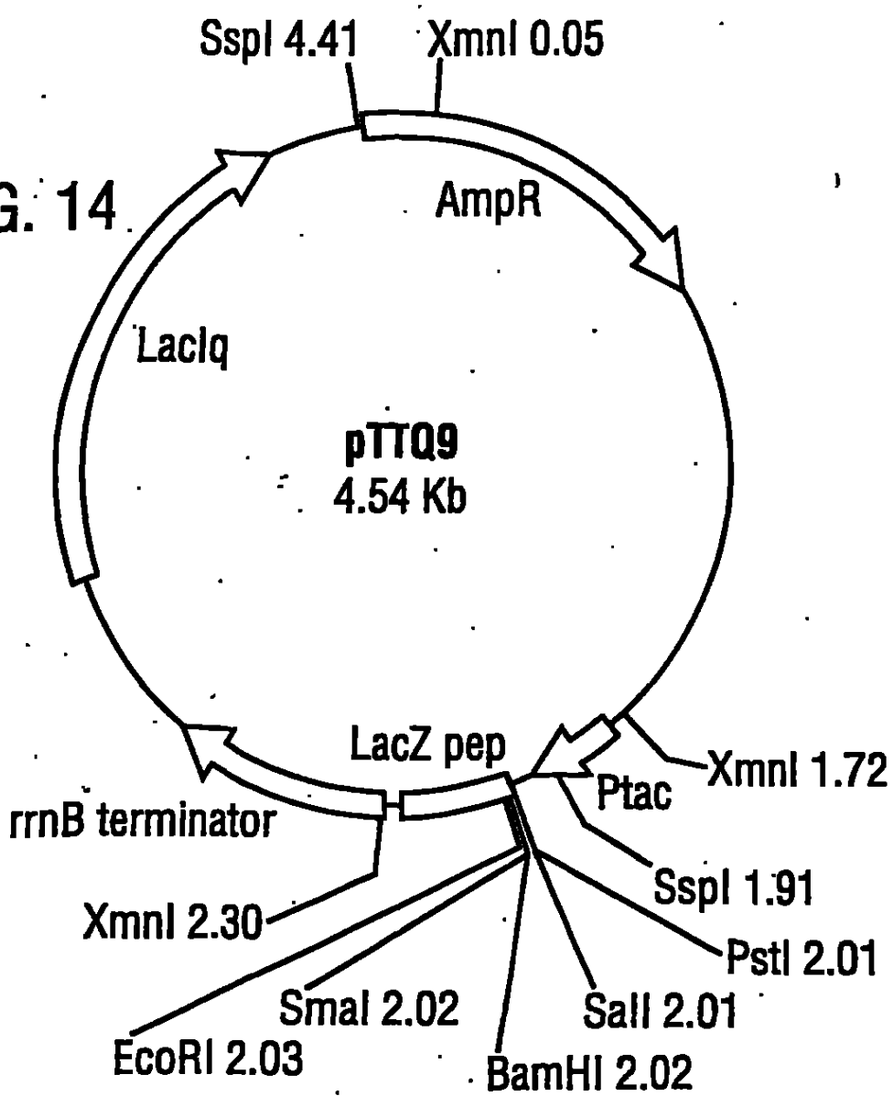

SspI 4.41
XmnI 0.05
AmpR
LacIq
pTTQ9
4.54 Kb
LacZ pep
Ptac
XmnI 1.72
rrnB terminator
XmnI 2.30
SspI 1.91
PstI 2.01
SmaI 2.02
SalI 2.01
EcoRI 2.03
BamHI 2.02

FIG. 16

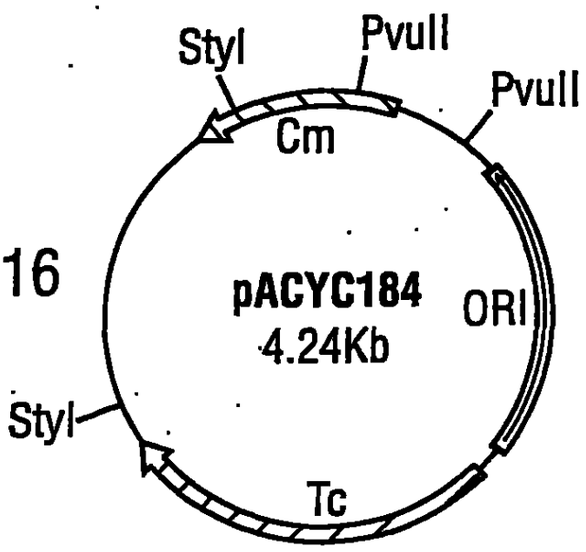
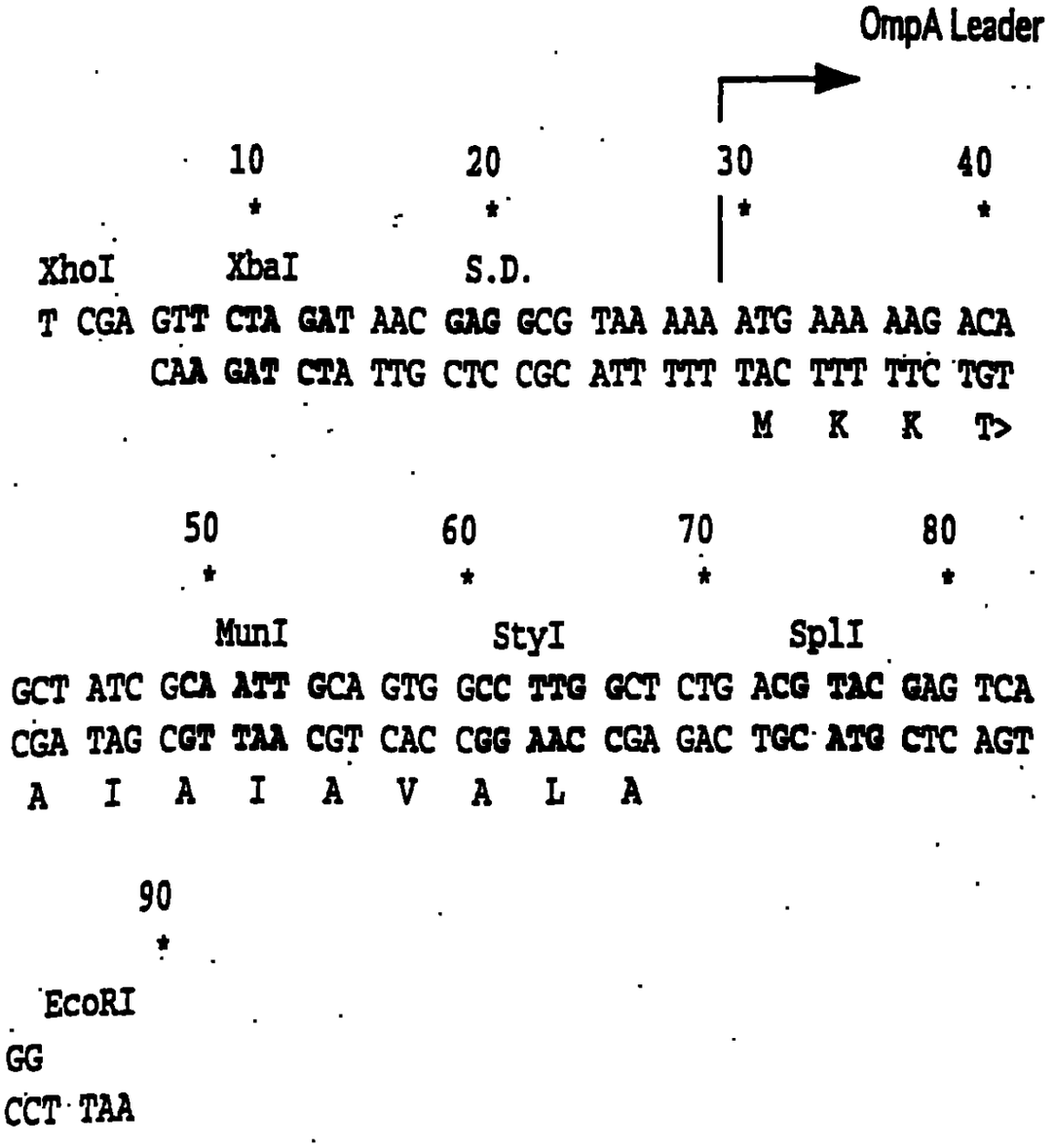

StyI
PvuII
PvuII
Cm
pACYC184
4.24Kb
ORI
StyI
Tc

FIG. 15

Sequence of OmpA Oligonucleotide Adapter (SEQ ID NO: 101)



- Internal restriction sites are shown in bold
- The 5' XhoI cohesive end ligates into the Vector SalI site, blocking it
- S.D. represents the OmpA Shine Dalgarno sequence

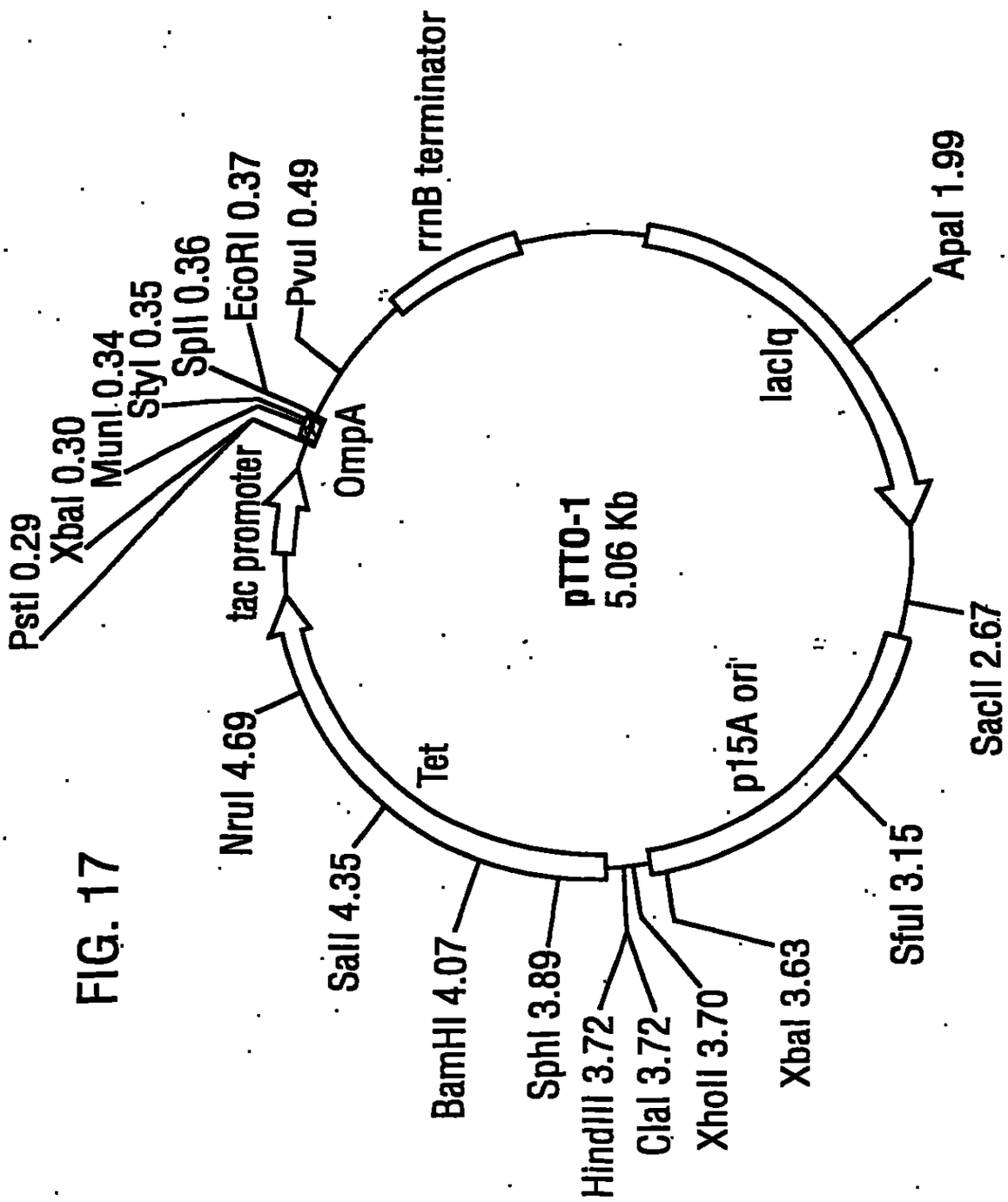

pTTO-1
5.06 Kb
rrnB terminator
ApaI 1.99
laclq
SacII 2.67
p15A ori
SfuI 3.15
XbaI 3.63
XhoII 3.70
ClaI 3.72
HindIII 3.72
SphI 3.89
BamHI 4.07
SalI 4.35
Tet
NruI 4.69
tac promoter
OmpA
PstI 0.29
XbaI 0.30
MunI 0.34
StyI 0.35
SpII 0.36
EcoRI 0.37
PvuI 0.49

FIG. 17

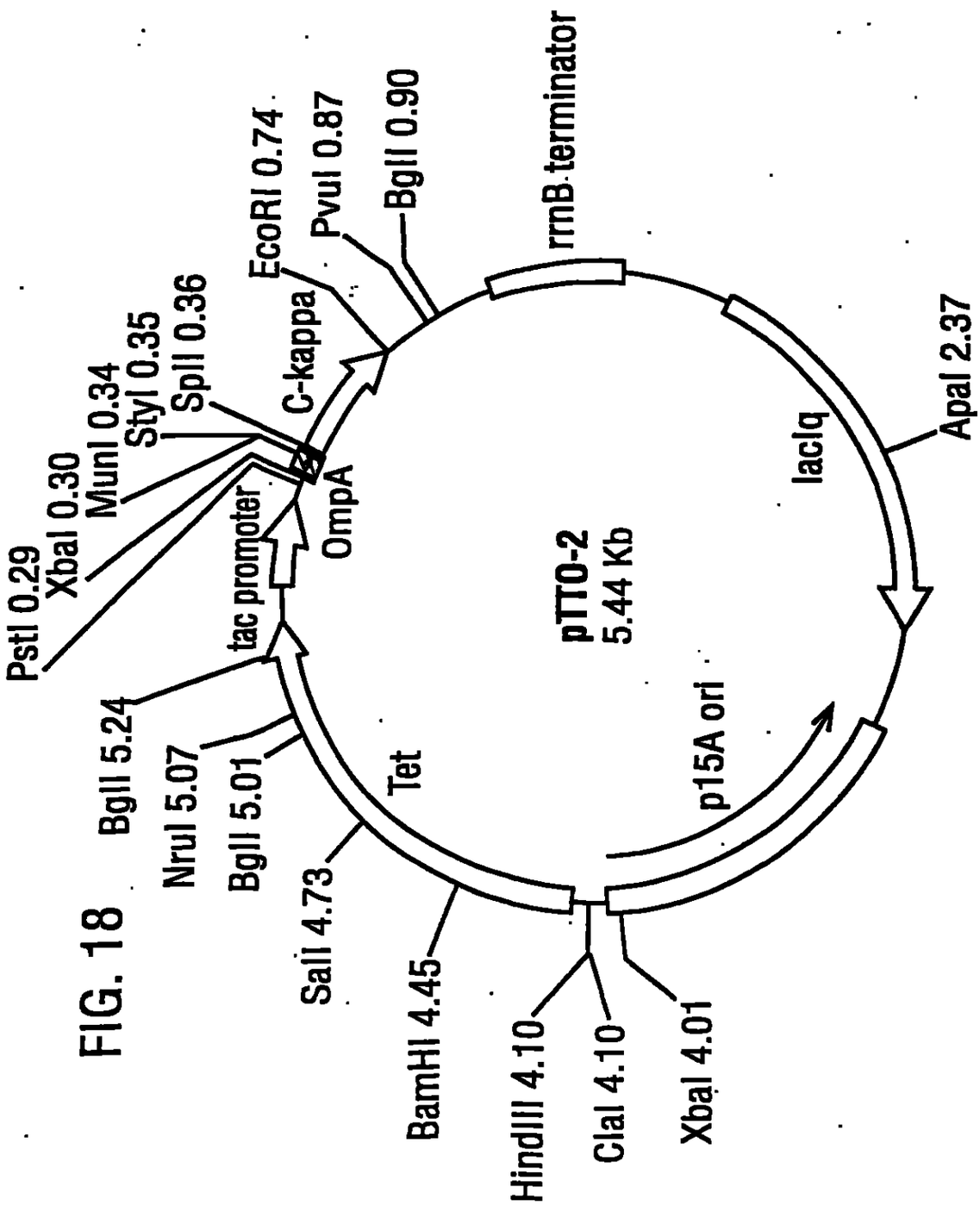

pTT0-2
5.44 Kb
rrnB terminator
BglII 0.90
PvuI 0.87
EcoRI 0.74
C-kappa
SpII 0.36
StyI 0.35
MunI 0.34
XbaI 0.30
PstI 0.29
tac promoter
OmpA
lacIq
ApaI 2.37
BglII 5.24
NruI 5.07
BglII 5.01
Tet
SalI 4.73
p15A ori
BamHI 4.45
HindIII 4.10
ClaI 4.10
XbaI 4.01

FIG. 18

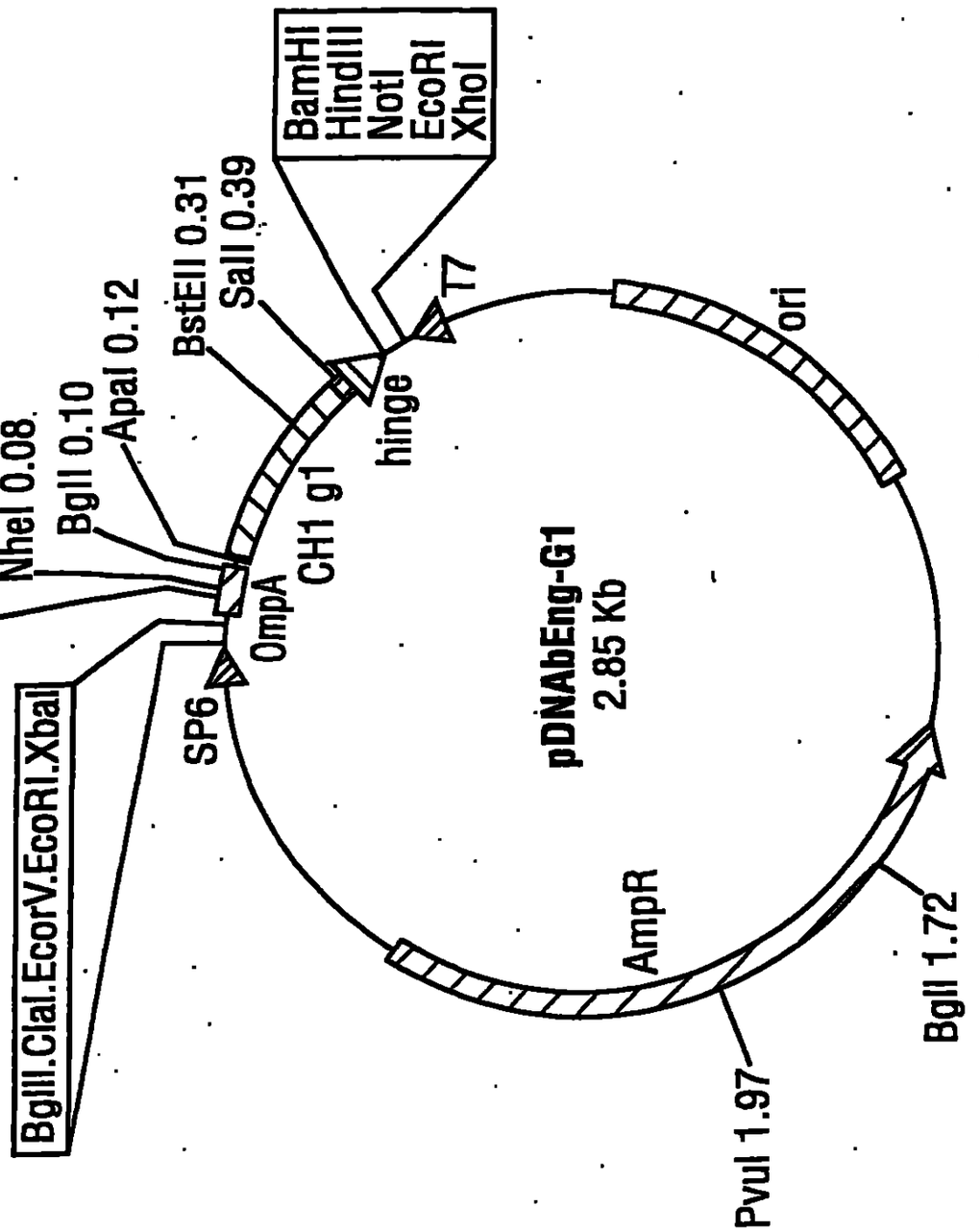

BamHI
HindIII
NotI
EcoRI
XhoI
T7
ori
BstEII 0.31
SalI 0.39
ApaI 0.12
BglI 0.10
NheI 0.08
MunI 0.07
hinge
CH1 g1
OmpA
SP6
BglII.ClaI.EcorV.EcoRI.XbaI
pDNAbEng-G1
2.85 Kb
AmpR
PvuI 1.97
BglI 1.72

FIG. 19

FIG. 20 OLIGONUCLEOTIDE CASSETTES ENCODING DIFFERENT INTERGENIC SEQUENCES FOR E. Coli Fab' EXPRESSION

IGS CASSETTE-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 (SEQ ID No: 102)

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

End of c-Kappa sequence -> *Start of OmpA sequence ->*

IGS CASSETTE-2; Intergenic space = +1

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

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

IGS CASSETTE-3; Intergenic space = +13

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

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

IGS CASSETTE-4; Intergenic space = +13

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

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

IGS1
IGS2
IGS3
IGS4
ORIGINAL
Periplasmic Fab' accumulation - IGS variants
ng/ml/OD
400
300
200
100
0
TIME (HOURS POST INDUCTION)
0
1
2
3
4
5

FIG. 21

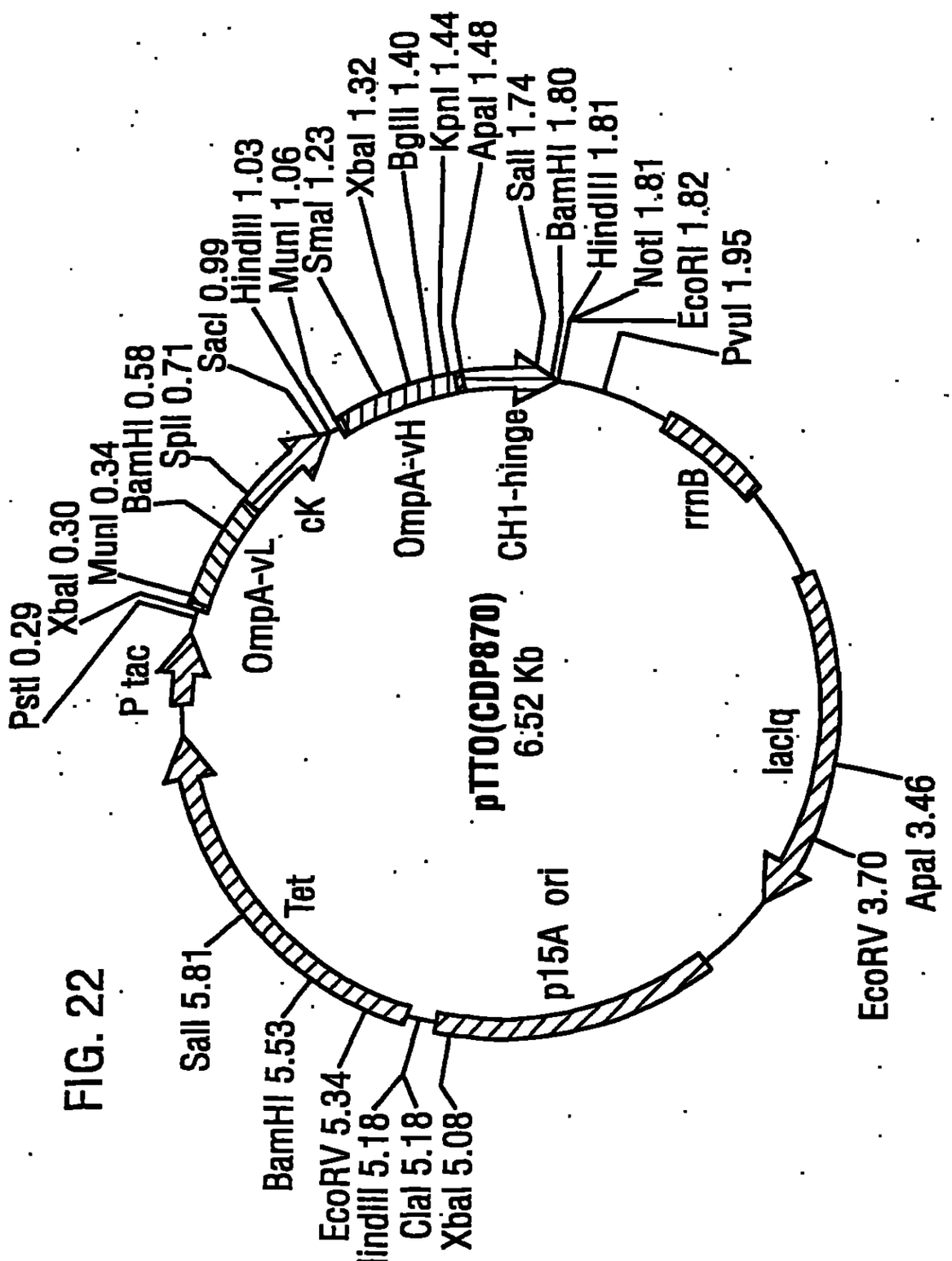
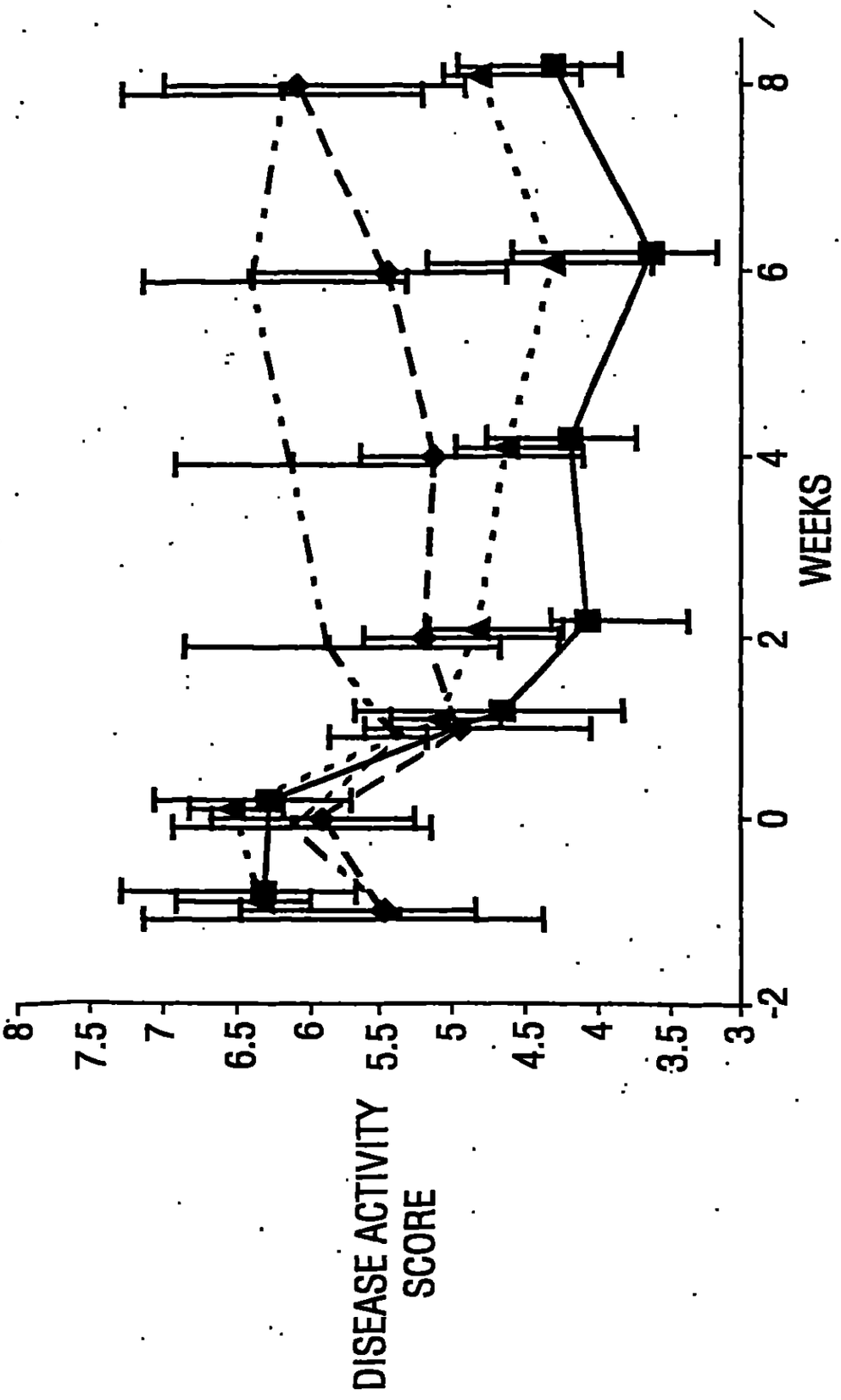

pTTO(CDP870)
6.52 Kb
PstI 0.29
XbaI 0.30
MunI 0.34
BamHI 0.58
SpII 0.71
SacI 0.99
HindIII 1.03
MunI 1.06
SmaI 1.23
XbaI 1.32
BglII 1.40
KpnI 1.44
ApaI 1.48
SalI 1.74
BamHI 1.80
HindIII 1.81
NotI 1.81
EcoRI 1.82
PvuI 1.95
ApaI 3.46
EcoRV 3.70
SalI 5.81
BamHI 5.53
EcoRV 5.34
HindIII 5.18
ClaI 5.18
XbaI 5.08
P tac
OmpA-vL
cK
OmpA-vH
CH1-hinge
rrnB
lacIq
Tet
p15A ori

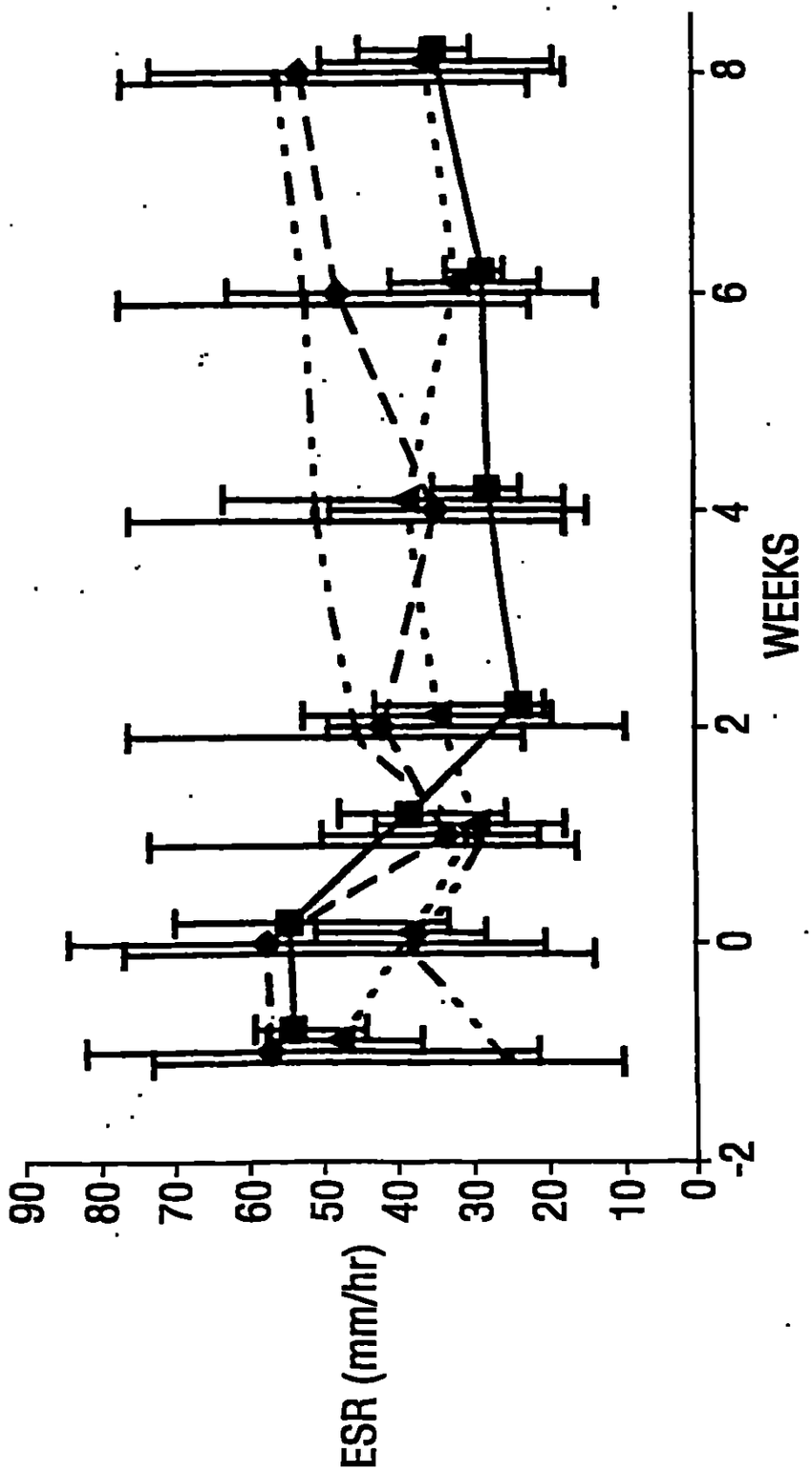
FIG. 22

FIG. 23



240

FIG. 24



241

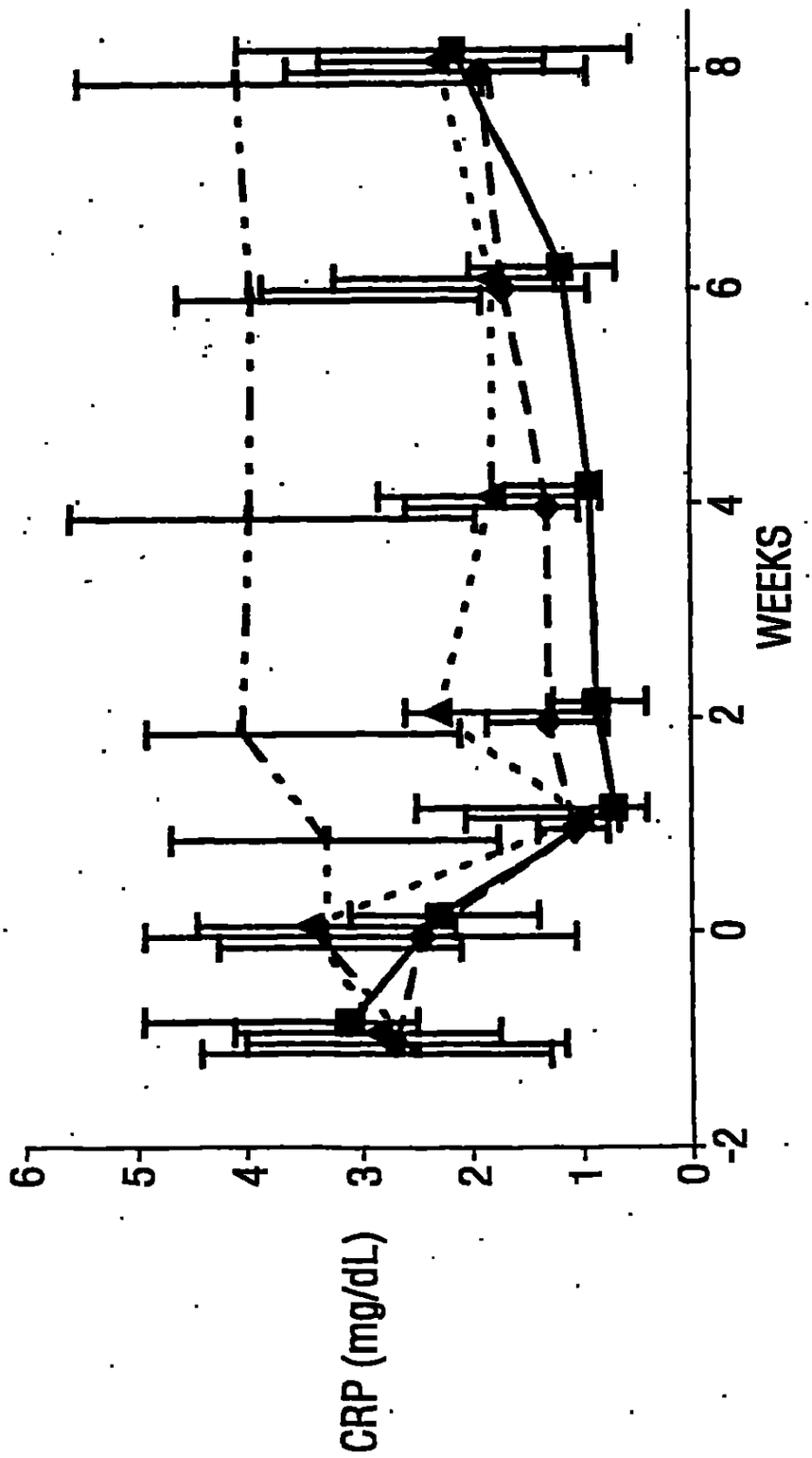


FIG. 24(contd.)

242

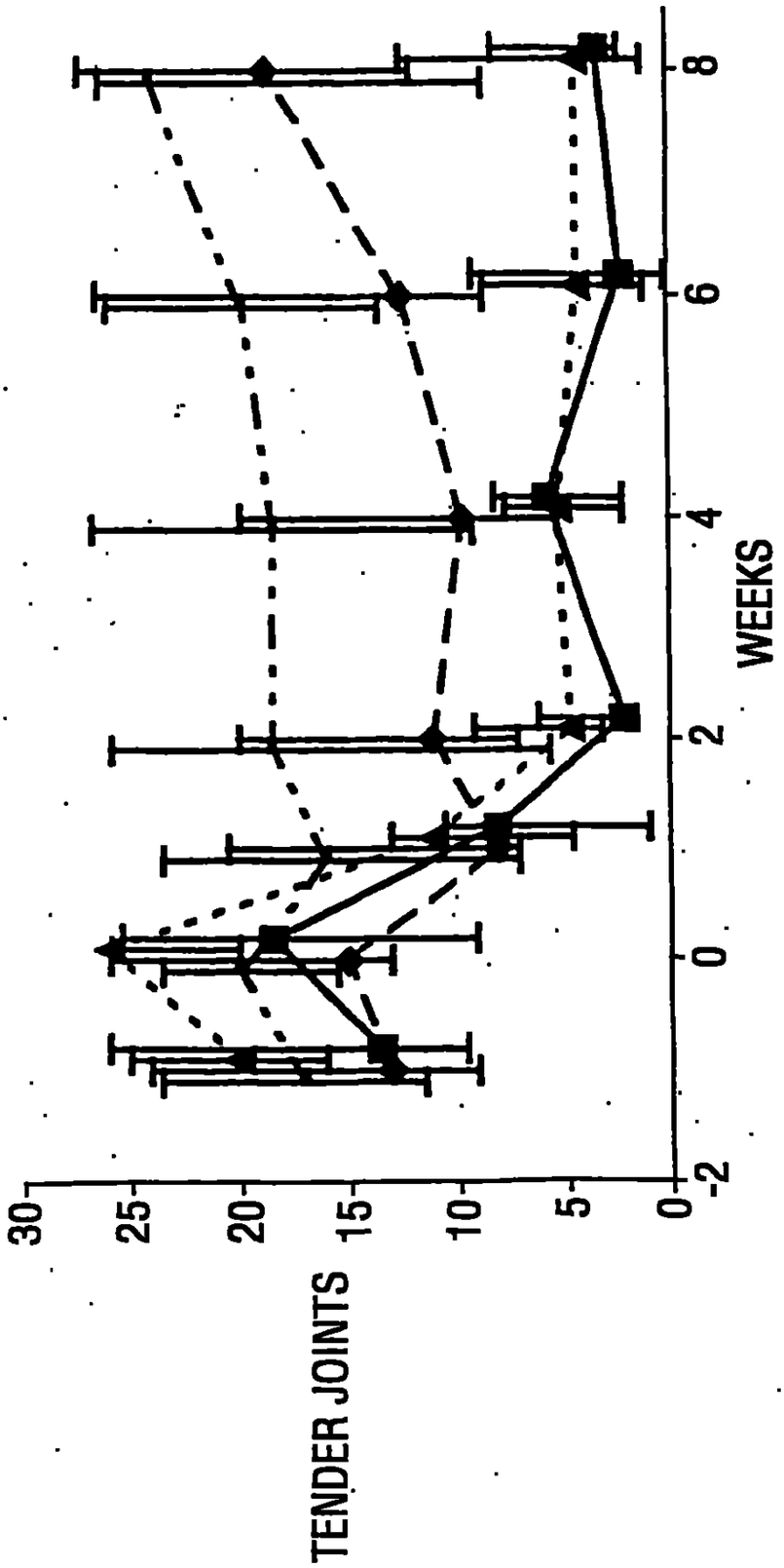


FIG. 24(contd.)

243

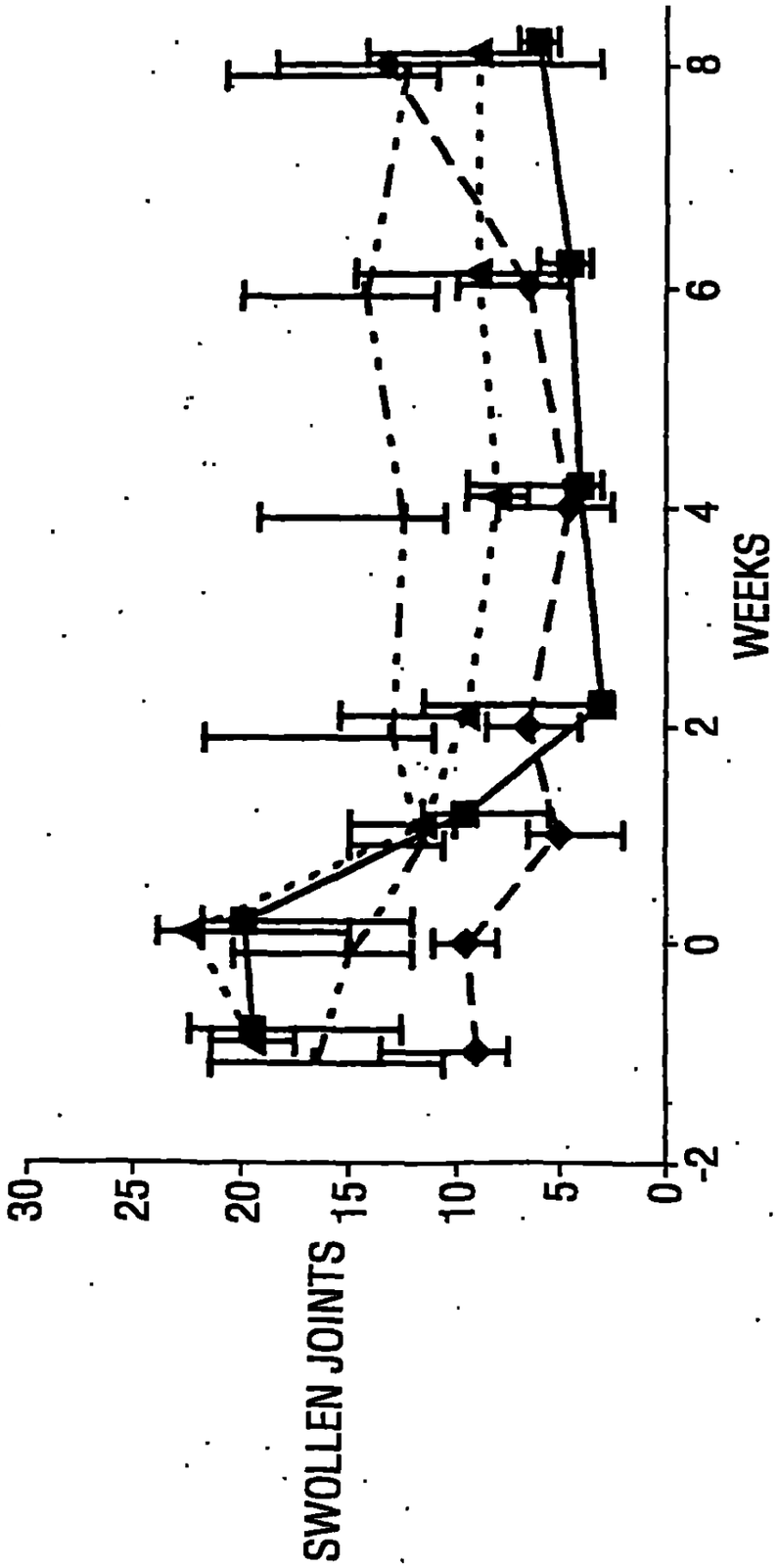


FIG. 24(contd.)

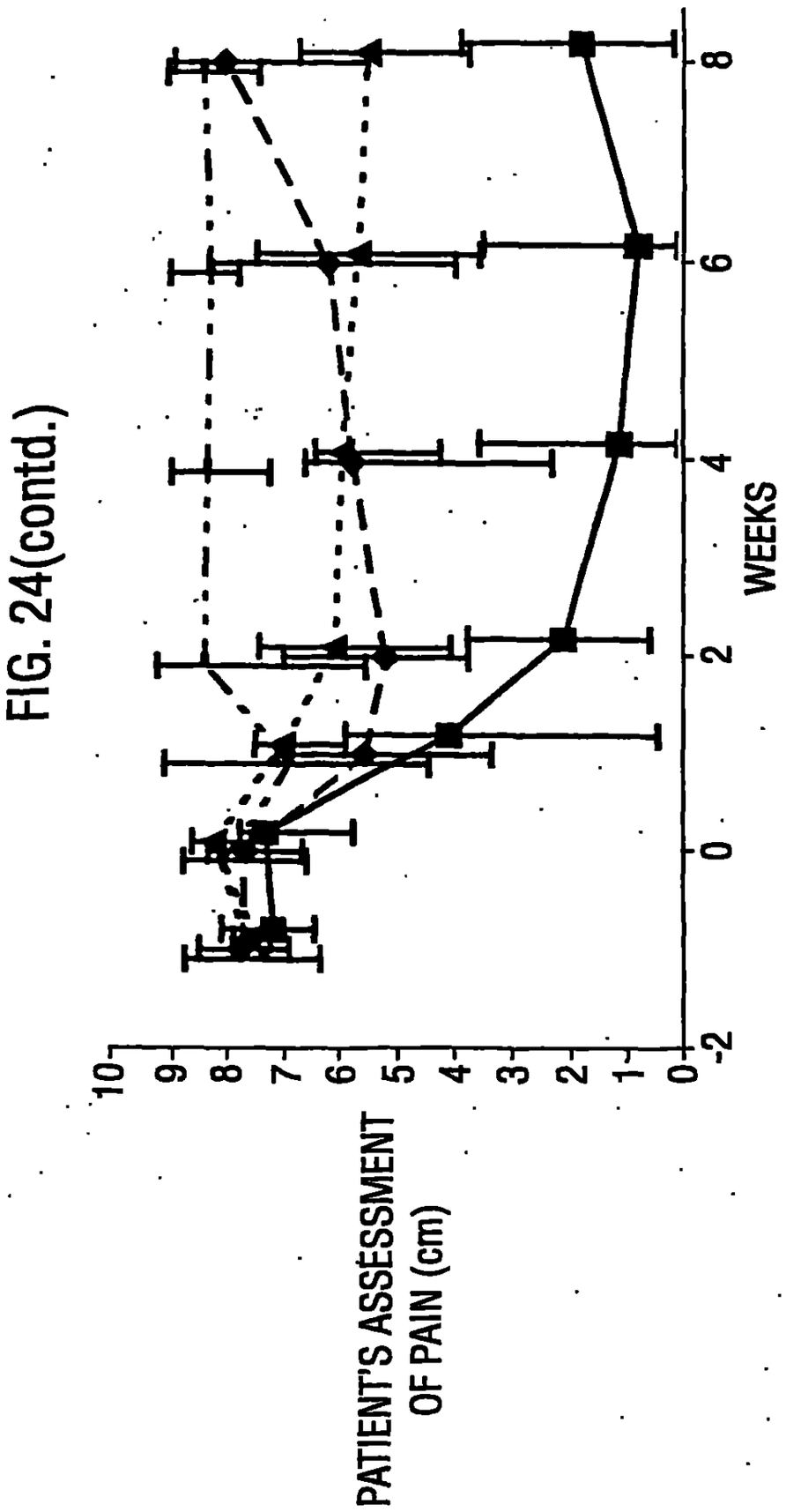


FIG. 24(contd.)

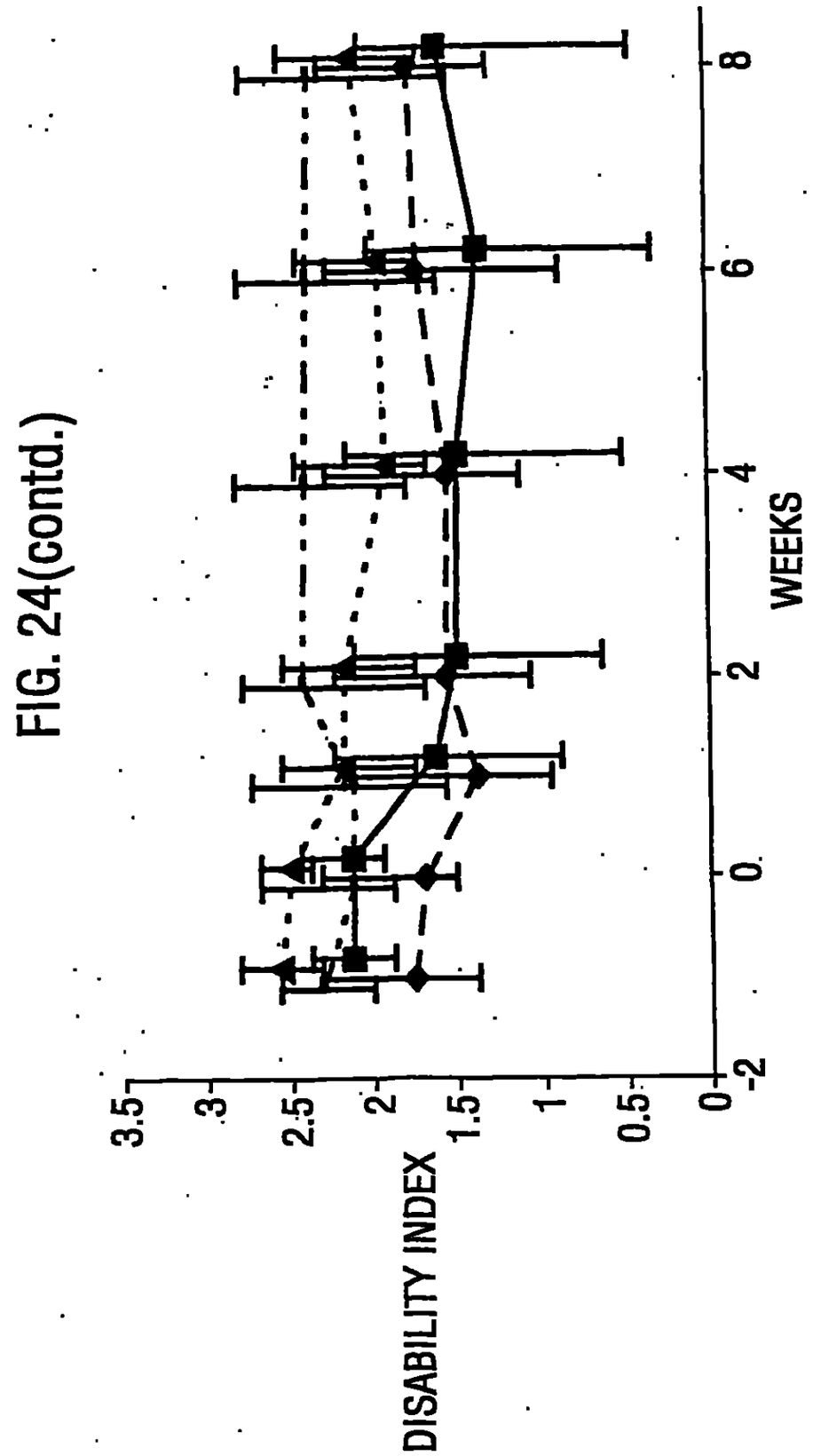
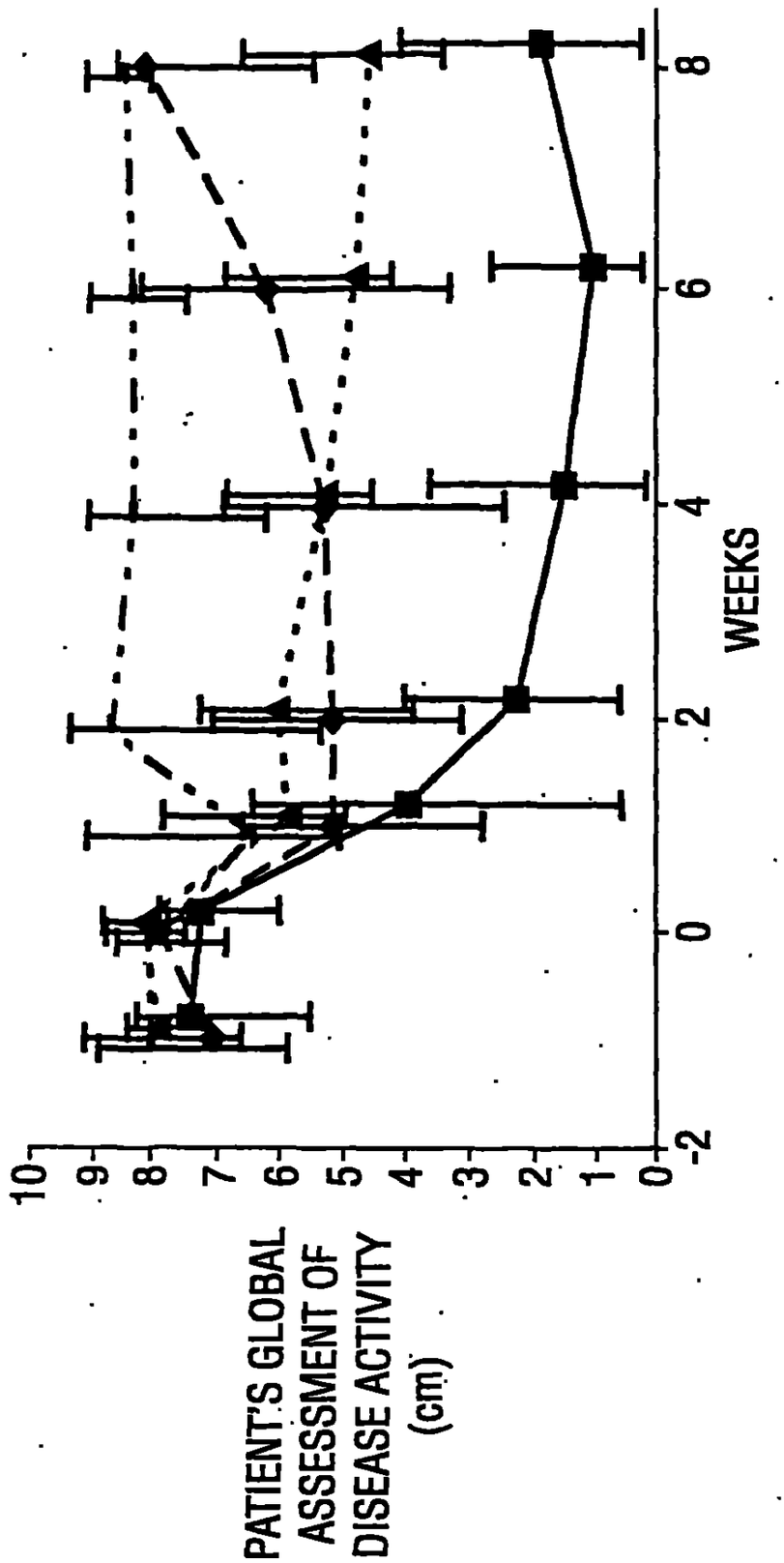


FIG. 24(contd.)

246

FIG. 24(contd.)



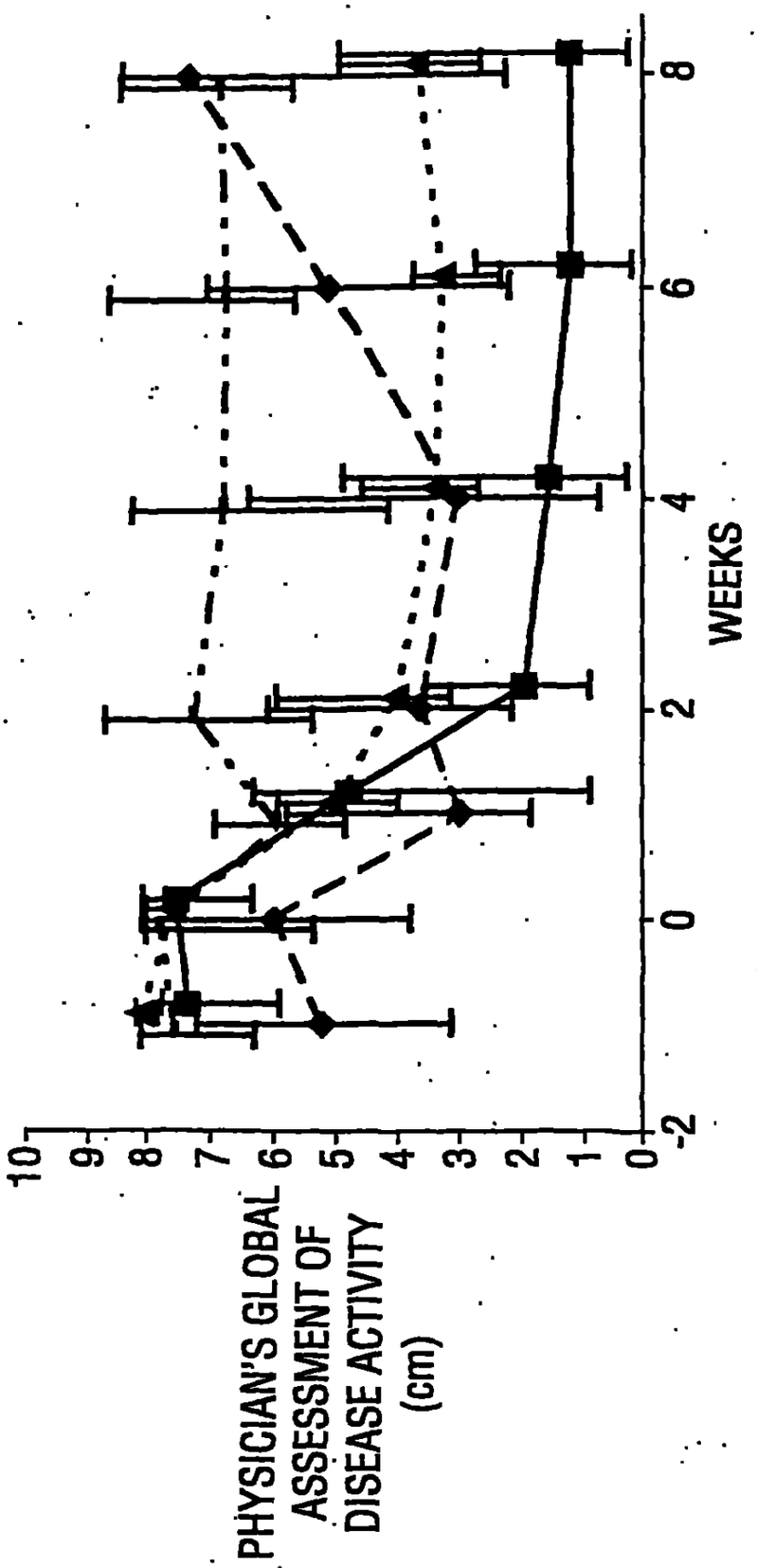

PHYSICIAN'S GLOBAL ASSESSMENT OF DISEASE ACTIVITY (cm)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-2
0
2
4
6
8
WEEKS

FIG. 24(contd.)

SEQUENCE LISTING

<110> CELLTECH-CHIROSCIENCE LIMITED

<120> BIOLOGICAL PRODUCTS

<130> P021741WO

<140>
<141>

<160> 115

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH1

<400> 1
Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40/human hybrid CDRH2

<400> 2
Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 8

EX9

250

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40-gL1

<400> 8
gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc ctg agc gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

gta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa gcc ctc atc 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga 192
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
50 55 60

tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc acg atc agt agc ctc cag cca 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
85 90 95

aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40-gL2

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

```
 1               5                  10                  15

gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
            20                  25                  30

gta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa ctc ctc atc   144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga   192
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc acg atc agt agc ctc cag cca   240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc   288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa                       321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 10
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:gh1hTNF40.4 (Figure 10)

```
<400> 10
cag gtg cag ctg gtc cag tca gga gca gag gtt aag aag cct ggt gct   48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:gh3hTNF40.4 (Figure 11)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 12
gccgccacc 9

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

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

<400> 13
atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

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

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

<400> 14
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

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

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

<400> 15
atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt 26

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

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

<400> 16
atgractttg ggytcagctt grt 23

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

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

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agtttt 26

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

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

<400> 18
atggctgtcy trgagctrct cttctg 26

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

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

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tmtctt 25

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

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

<400> 20

atgagagtgc tgattctttt gtg 23

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

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

<400> 21
atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

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

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

<400> 22
atgggcagac ttacattctc attcct 26

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

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

<400> 23
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

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

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

<400> 24
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

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

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

<400> 25

gcgcgcaagc ttgccgccac c 21

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

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

<400> 26
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct 29

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

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

<400> 27
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

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

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

<400> 28
atgagtgtgc tcactcaggt cct 23

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

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

<400> 29
atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

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

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

<400> 30
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

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

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

<400> 31
atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

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

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

<400> 32
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

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

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

<400> 33
atgggcwtca agatggagtc aca 23

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

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

<400> 34
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

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

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

<400> 35
atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 36
<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 36
atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

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

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

<400> 37
atggaagccc cagctcagct tctctt 26

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

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

<400> 38
atgragtywc agacccaggt cttyrt 26

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

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

<400> 39
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

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

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

<400> 40
atggattcac aggcccaggt tcttat 26

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

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer CL14

<400> 41
atgatgagtc ctgcccagtt cctgtt 26

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer CL15

<400> 42
atgaatttgc ctgttcatct cttggtgct 29

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer CL16

<400> 43
atggattttc aattggtcct catctcctt 29

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17A

<400> 44
atgaggtgcc tarctsagtt cctgrg 26

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17B

<400> 45
atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

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

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

<400> 46
atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

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

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

<400> 47
ggactgttcg aagccgccac c 21

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

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

<400> 48
ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt 30

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

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

<400> 49
gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrgag acdgtga 37

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

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

<400> 50
gctgacagac taacagactg ttcc 24

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

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

<400> 51
gctctcggag gtgctcct 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7986

<400> 56
atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggta 60
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

<210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7981

<400> 57
gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7980

<400> 58
gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 59
gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5350

<400> 60
tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5349

<400> 61
gcagatggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R684

<400> 62
ttcaactgct catcagat 18

<210> 63
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7989

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

<210> 64
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7990

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

<210> 65
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7991

<400> 65
ccaacccatc catttcaggc cttgtcccgg ggcctgcttg acccaattca taccatagtc 60
tgtgaacacg t 71

<210> 66
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7995

<400> 66
ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcacgtt c 81

<210> 67
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7992

<400> 67
ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

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

<210> 69
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7994

<400> 69
gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer P7988

<400> 70
gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 71
gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

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

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

<400> 72
gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60
aattc 65

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

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

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

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

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

<400> 74
ccaacccatc catttcaggc cctttcccgg ggcctgctta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

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

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

<400> 75
ggaggtatgc tgttgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76
<211> 62

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

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

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

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

<400> 77
gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

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

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

<400> 78
gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

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

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

<400> 79
cgcgcggcaa ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60
atgacccaga gccc 74

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

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

<400> 80
ttcaactgct catcagatgg 20

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

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

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

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

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

<400> 82
gcctgagttc cacgacac 18

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

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

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

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

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

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
20

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 87
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<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> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus framework H2

<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> Artificial Sequence

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus framework H3

<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> Artificial Sequence

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

<400> 96
Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<223> Description of Artificial Sequence:OmpA oligonucleotide adaptor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 103
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 107

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> Grafted Heavy Chain for Fab

<400> 110
gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggt ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60
tcctgtgctg catctggtta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180
gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt 648

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

<220>
<223> Grafted Heavy Chain for Fab

<400> 111
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215

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

<220>
<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 112
gacattcaaa tgacccagag cccatccagc ctgagcgcat ctgtaggaga ccgggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggt actaacgtag cctggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaagccct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
aggttcagcg gatccggtag tggtactgat ttcaccctca cgatcagtag cctccagcca 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccactcac attcggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642

<210> 113
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 113
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

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

<400> 114
gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggt ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60
tcctgtgctg catctggtta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180
gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 687

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

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

<400> 115
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/13 C07K16/24 C07K16/46 A61K47/48 C07K19/00
C12N15/62 C12N15/70 C12N1/21 A61K39/395 A61P19/02
A61P37/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 25971 A (CELLTECH THERAPEUTICS LIMITED) 18 June 1998 (1998-06-18) examples 2,5,6 claims	1-4,13, 15,16, 26, 28-32, 60-64,67
Y		6-12,14, 17-23, 27, 33-41, 49-54, 56-59

-/—

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 August 2001	22/08/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Nooij, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/02477

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9825971 A	18-06-1998	AU 733251 B	10-05-2001
		AU 5404998 A	03-07-1998
		EP 0948544 A	13-10-1999
		GB 2334957 A,B	08-09-1999
WO 9211383 A	09-07-1992	AT 137534 T	15-05-1996
		AT 134387 T	15-03-1996
		AU 669083 B	23-05-1996
		AU 7772394 A	09-03-1995
		AU 651984 B	11-08-1994
		AU 8200591 A	04-02-1992
		AU 657937 B	30-03-1995
		AU 9108491 A	22-07-1992
		BG 60462 B	28-04-1995
		BR 9007197 A	28-01-1992
		BR 9106232 A	30-03-1993
		CA 2065325 A	06-01-1992
		CA 2076540 A	22-06-1992
		CA 2129554 A	22-06-1992
		DE 4193302 C	24-08-2000
		DE 4193302 T	18-02-1993
		DE 69022982 D	16-11-1995
		DE 69022982 T	28-03-1996
		DE 69117284 D	28-03-1996
		DE 69117284 T	05-09-1996
		DE 69119211 D	05-06-1996
		DE 69119211 T	19-12-1996
		DK 516785 T	18-03-1996
		EP 0460167 A	11-12-1991
		EP 0491031 A	24-06-1992
		EP 0516785 A	09-12-1992
		EP 0626389 A	30-11-1994
		EP 0927758 A	07-07-1999
		ES 2084338 T	01-05-1996
		FI 923737 A	20-08-1992
		GB 2246570 A,B	05-02-1992
		GB 2251859 A,B	22-07-1992
		GB 2257145 A,B	06-01-1993
		GB 2276169 A	21-09-1994
		GB 2279077 A,B	21-12-1994
		GR 3017734 T	31-01-1996
		GR 3019066 T	31-05-1996
		HU 62661 A	28-05-1993
		HU 215383 B	28-03-2000
		HU 9500283 A	28-12-1995
		JP 10136986 A	26-05-1998
		JP 3145401 B	12-03-2001
		JP 5502587 T	13-05-1993
		KR 253426 B	15-04-2000
		NL 9120013 T	02-11-1992
		NO 913228 A	21-10-1991
		NO 923231 A	20-10-1992
WO 9964460 A	16-12-1999	AU 4278399 A	30-12-1999
		DE 19983347 T	28-06-2001
		EP 1090037 A	11-04-2001
		GB 2354242 A	21-03-2001

Industria y Comercio

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS

Royal Technologies S.A.

283

Item		Expediente No 02008005	No de Folio
		No de unidades	√
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA ✓	3	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final

283
284

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02004005 00000000 Folios: 283
Fecha (AMD): 2002-02-01 16:54:57
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 900176089-2

ECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 4,979
ECHA : ENERO 21 DE 2002

C O N S I G N A C I O N

EPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
AVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	0087303	21/01/2002	27,822,400.00

C O N C E P T O

ANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		378,000.00
		TOTAL :	$	378,000.00

ON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

ESPONSABLE :

ECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE NO:

C/o 13115-841-001-2

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

285
285

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN [4] **MODELO DE UTILIDAD**	[ ]	[ ]
1 • Indicación de que se solicita la concesión de una patente	[ ]	[ ]
1 • Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[ ]	[ ]
3 • Descripción de la invención	[ ]	[ ]
• Dibujos de ser estos pertinentes	[ ]	[ ]
283 • Comprobante de Pago de las tasas establecidas	[ ]	[ ]
COMPLETA [ ] INCOMPLETA	[ ]	[ ]
DISEÑO INDUSTRIAL [ ]		
• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	[ ]	[ ]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	[ ]	[ ]
• Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño .	[ ]	[ ]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.	[ ]	[ ]
COMPLETA [ ] INCOMPLETA	[ ]	[ ]
ESQUEMA DE TRAZADO [ ]		
• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.	[ ]	[ ]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	[ ]	[ ]
• Representación gráfica del esquema de trazado	[ ]	[ ]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.	[ ]	[ ]
COMPLETA [ ] INCOMPLETA	[ ]	[ ]

Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Fech Radicacion : 02000005 00000000 Folios: 283
Fecha (AMD): 2002-02-01 16:54:57
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27 00, Piso 2 Edificio
Centralizado [illegible]
Conmutador [illegible]
Línea gratuita [illegible]
Bogotá D.C. - Colombia