



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04 41969

54. TÍTULO

Productos Biologicos

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 16/00

71. SOLICITANTE

Celltech RyD Limited

DOMICILIO

Berkshire, Reino Unido

74. APODERADO

Emilio Ferrero

codigo N. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y COLECCIÓN

Radicación : 8:241969 L22-22-2

Folios: 143

Fecha (6/8): 2004-02-03 17:00:50

Trámite : 011 PCT-FATEKT 379 FASE NACI 411 PRESENTA

Dependencia: 2328 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 3WE, Reino Unido 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@camvp.com. Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: 438.019 T.P. 31.929
4	INVENTOR (ES) (72)	1. George Andrew POPPLEWELL 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido 2. Peter Simon TICKLE 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido 3. Karen ZINKEWICH-PEOTTI 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido 4. Kendall Robert MORRISON 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido	
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/GB02/04619</u> Fecha: <u>10 de octubre de 2002</u> Publicación Internacional No. <u>WO 03/031475 A2</u> Fecha: <u>17 de abril de 2003</u>		
6	Título (54) PRODUCTOS BIOLÓGICOS		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 16/00</u>		

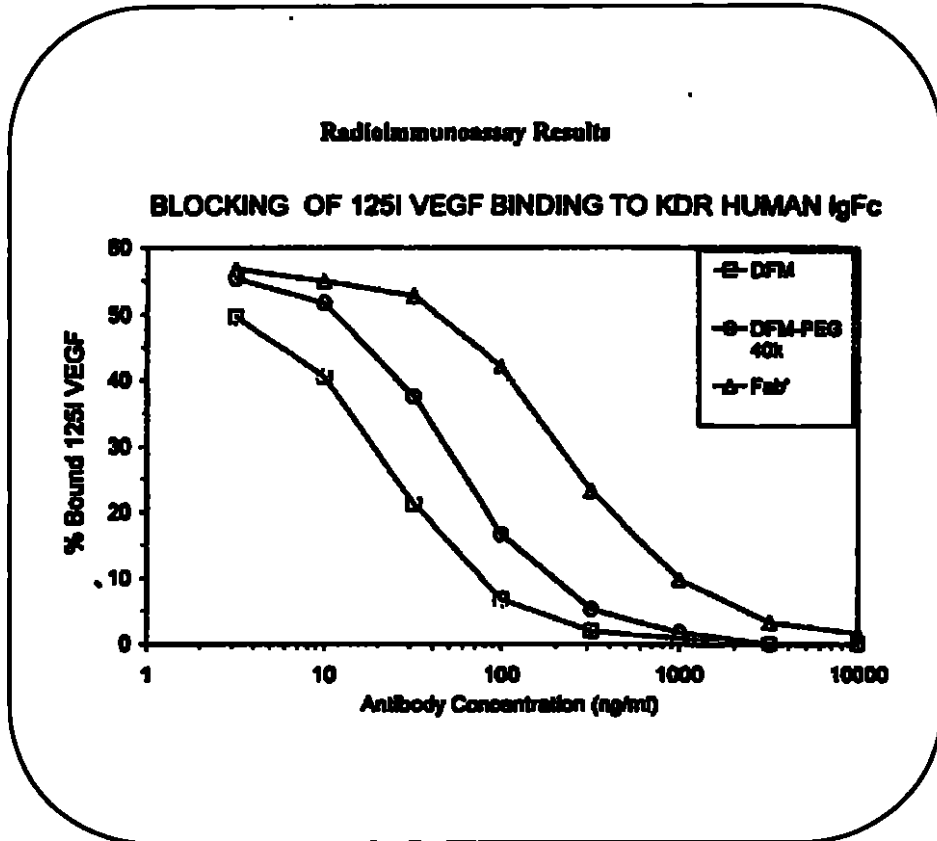
8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	GB	10 de octubre de 2001	0124317.9

9	Comprobante de pago No.: 04 - 28,813	Fecha: 12 de abril de 2004
----------	---	-----------------------------------

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00.
☐	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)
☒	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

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DLM

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

CELLTECH R&D LIMITED
domiciliado (s) en/of **208 BATH ROAD**

SLOUGH, BERKSHIRE SL1 3WE

UNITED KINGDOM

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72 35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, to which effect I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before all authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate,

an. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del
so, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de
antes officiosos.

admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts
done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 24 January 2002

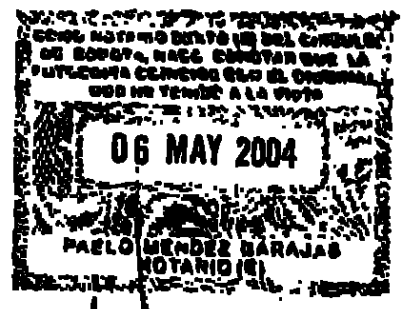
en/in Slough, U.K.

por/by [Signature]

Firma

Signature

JOHN ANDREW AUKMAN SLATER
COMPANY SECRETARY



ATENCION NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL AUTHENTICATION (COMPANY)

El Notario Certifica: Que la firma que antecede de

John SLATER

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo

de SECRETARIO de la SOCIEDAD

de la compañía CELLTECH R.D LTD

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a

las leyes de Inglaterra

que la dirección de dicha compañía es 208 Bath Rd

Slough

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Windsor

El 24 Enero 2002

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature

of JOHN SLATER

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

CO SECRETARY

of the company CELLTECH R.D LTD

a company currently existing and organized under the laws of

ENGLAND

that the address is 208 BATH RD

SLUGH

and that the signatory has the power to grant this document.

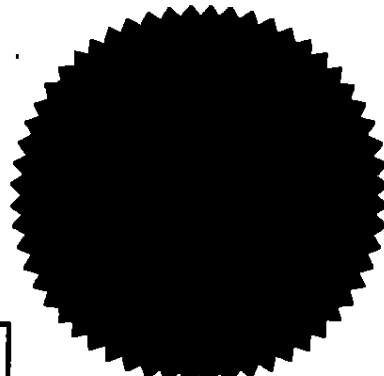
The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Windsor

On 24 January 2002

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

Philip H. Jones



APOSTILLE

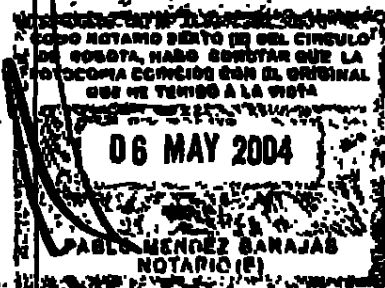
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country:
- This public document
- has been signed by
- acting in the capacity of
- bears the seal/stamp of

Certified

- at
6. the
- by
- No.
- Seal/stamp
10. Signature

Philip H. Jones
Solicitor & Notary
Maiden House, Maiden Wt.,
Windsor, SL4 1EU England
01753 651591



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

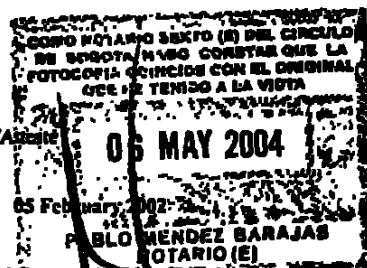
2. Has been signed by Phillip H Jones
a été signé par

3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/limbre de

Certified/Attesté

6. the/le 05 February 2002



5. at London/Londres

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G987139

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: T. S. Cunningham



[Handwritten signature]

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

7

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 14.02/02 realizada por Diego Vargas,
Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de
Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un
documento de Representación y Poder escrito en inglés y español
por medio del cual CELLTECH R&D LIMITED domiciliado en el 208
BATH ROAD, SLOUGH, BERKESHIRE SL1 3WE, REINO UNIDO, otorga
derechos de representación y poder a los Doctores EMILIO FERRERO,
tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ,
tpa. 23555 y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832.

Dado y firmado hoy 24 de Enero de 2002

En Slough, Reino Unido

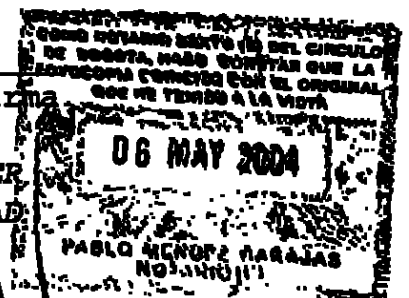
Por _____

Firma Ilegible

Firma

JOHN ANDREW DUNCAN SLATER
SECRETARIO DE LA SOCIEDAD

Firma

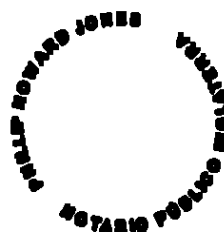


AUTENTICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en donde se certifica la
anterior firma de JOHN SLATER, así como de su cargo como
Secretario de la Sociedad, compañía actualmente existente y
constituida de acuerdo a las leyes de Inglaterra con dirección en
el 208 BATH RD, SLOUGH. Adicionalmente se certifica que el
signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Dado y firmado en Windsor

El 24 de Enero de 2002

Firma ilegible
Notario Público
(Sello-Firma)



Sello: Phillip H. Jones
Abogado y Notario
Madeira House, Madeira Walk,
Windsor, SL4 1EU Inglaterra
07153 851591

(ANEXO)

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 de 1961/ Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

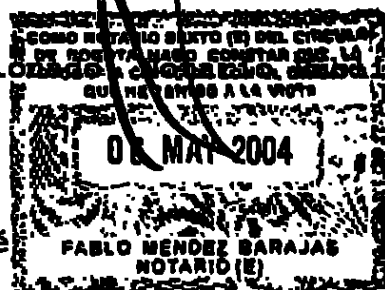
Este documento público/ Le présent acte public

2. Ha sido firmado por Phillip H Jones
a été signé par

3. Actuando en calidad de Notario Público
agissant en qualité de

4. lleva el sello/estampilla de El Mencionado/ Le présent acte public
est revêtu du sceau/timbre de

Certificado/Attesté



5. en Londres/ à Londres
6. El/le 05 de Febrero de 2002

7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos
Extranjeros y de la Comunidad /

par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté Britannique aux
Affaires Etrangères et du Commonwealth

8. Número/ sous No. G987139

9. Estampilla:
timbre:

10. Firma: T.S. Cunningham



Imagen Obtenida por Escáner

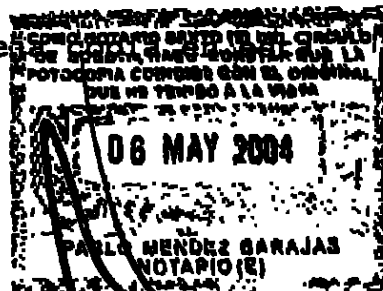
Firma Ilegible

LEYENDA: OFICINA DE RELACIONES EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD LONDRES
Aparece un sello seco semejante al descrito anteriormente

Por el Secretario de Estado /Pour le Secrétaire d'Etat

Es traducción fiel y completa de la cual se des
oficina para su confrontación.

/COLO 13115-841-001-2/DVZ/ID:3087/WPCL002G



Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

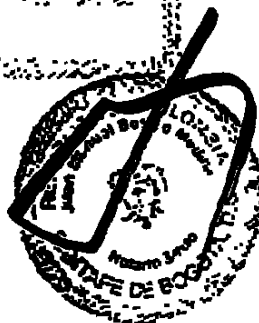
206899

2002 FEB 14 A 11:31

Diego Vargas
DOCUMENTO DESEMPLEADO
LAS FUNCIONES INDICADAS

OFICINA DE RELACIONES
EXTERIORES DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIORES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR *Diego Vargas*
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s) *206899*
ES(SON) AUTENTICA(S)
SANTAFE DE BOGOTÁ, 14 FEB 2002



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
06 MAY 2004
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/031475 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/GB02/04619

(22) International Filing Date: 10 October 2002 (10.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0124317.9 10 October 2001 (10.10.2001) GB

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): POPPLEWELL, Andrew, George [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). TICKLE, Simon, Peter [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE

(GB). ZINKEWICH-PEOTTL, Karen [GB/GB]; 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). MORRISON, Robert, Kendall [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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

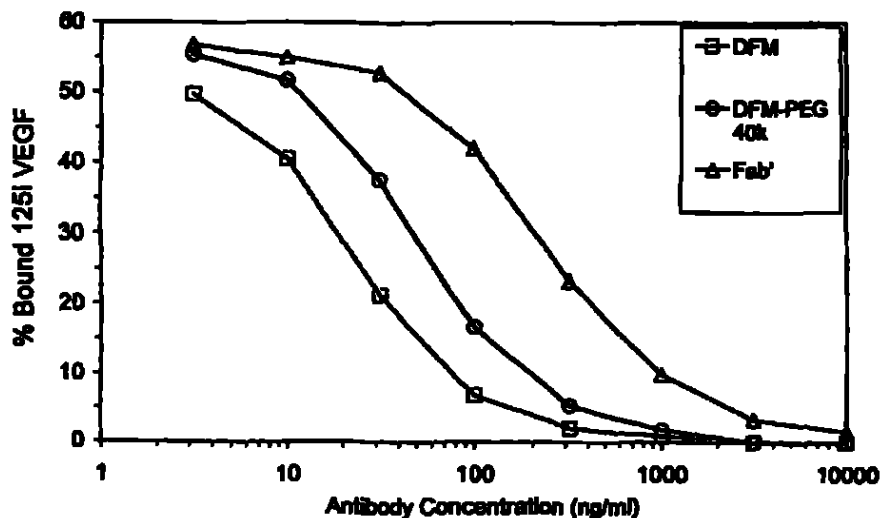
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: BIOLOGICAL PRODUCTS

Radioimmunoassay Results

BLOCKING OF 125I VEGF BINDING TO KDR HUMAN IgFc



(57) Abstract: There are disclosed antibody molecules containing at least one CDR derived from a mouse monoclonal antibody having specificity for human KDR. 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 in which VEGF and/or KDR are implicated.

WO 03/031475 A2

WO 03/031475 A2



TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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.

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

Biological Products

The present invention relates to an antibody molecule having specificity for antigenic determinants of human kinase insert domain-containing receptor (KDR). The antibody molecule binds KDR with greater affinity than human vascular endothelial growth factor (VEGF) and prevents the interaction between VEGF and KDR. 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 complementarity determining regions (CDRs). 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 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 (Mab) are grafted onto the framework regions of the variable domains of a human immunoglobulin by site directed mutagenesis using long
5 oligonucleotides.

The earliest work on humanising Mabs by CDR-grafting was carried out on Mabs recognising synthetic antigens, such as NP. However, examples in which a mouse Mab recognising lysozyme and a rat Mab recognising an antigen on human T-cells were humanised by CDR-grafting have been described by Verhoeyen et al. (Science, 239, 1534-
10 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
15 donor framework region. Proposed criteria for selecting which framework residues need to be altered are described in International Patent Application No. WO 90/07861.

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

VEGF is a homodimeric glycoprotein of two 23kD subunits with structural
20 similarity to PDGF. It has an important developmental role in vasculogenesis, the establishment of a system of new blood vessels, and is involved in angiogenesis, the formation of new vessels from pre-existing ones. Angiogenesis involves the proliferation, migration and tissue infiltration of capillary endothelial cells from pre-existing blood vessels. As well as playing an important role in normal physiological processes, such as
25 embryonic development, follicular growth (including corpus luteum formation) and wound healing, angiogenesis occurs in a number of pathological conditions including inflammation, psoriasis, rheumatoid arthritis and tumour growth and metastasis (Folkman, J and Klagsbrun, M., Science, 235:442-447, 1987). For example, it is widely believed that
30 tumours are incapable of growing beyond a certain size unless they are provided with a dedicated blood supply via angiogenesis.

VEGF is distinct from other factors implicated as possible regulators of angiogenesis *in vivo* in that it is an endothelial cell-specific angiogenesis inducer.

Five different monomeric isoforms of VEGF exist, resulting from alternative splicing of mRNA. The isoforms include two membrane bound forms (VEGF₂₀₆ and VEGF₁₈₉) and three soluble forms (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ and VEGF₁₄₅). In all tissues except human placenta, VEGF₁₆₅ is the most abundant isoform.

5 The effects of VEGF are mediated through its interaction with two high affinity tyrosine kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor (FLT-1 or VEGFR-1, Shibuya M. et al., *Oncogene*, 5, 519-524, 1990) and KDR (or VEGFR-2, Terman et al., *Oncogene*, 6, 1677-1683, 1991). Both KDR and FLT-1 are membrane-spanning receptors that each contain seven immunoglobulin-like domains in the extracellular ligand-binding region, an
10 intracellular tyrosine kinase domain and a transmembrane domain. The transmembrane domain serves to anchor the receptor in the cell membrane of the cells in which it is expressed.

There are several reports of the over-expression of both VEGF and its receptors within tumours, both at the RNA and protein levels (Dvorak et al., *Curr. Top. Microbiol.*
15 *Immunol.*, 237, 97, 1999). VEGF expression is upregulated in response to hypoxia, which frequently occurs within tumours, and increased concentration of ligand induces the expression of its receptors. Examples of studies showing increased KDR expression in human tumours include: breast cancer (Brown et al., *Hum. Pathol.*, 26, 86, 1995); colon cancer (Takahashi et al., *Cancer Res.*, 55, 3964, 1995); renal cancer (Takahashi et al.,
20 *BBRC* 257, 855, 1999) and adenocarcinoma of the gastro-intestinal tract (Brown et al., *Cancer Res.*, 53, 4727, 1993). In a more recent study using an antibody specifically recognising VEGF bound to KDR, upregulation of the VEGF/KDR angiogenic pathway in non-small cell lung cancer was observed (Koukourakis et al., *Cancer Res.*, 60, 3088, 2000).

A number of pieces of experimental evidence demonstrate the causal link between
25 VEGF activity and tumour angiogenesis *in vivo*. Kim et al. injected an anti-VEGF neutralising Mab into tumour-bearing nude mice and showed suppressed tumour growth (*Nature* 362, 841, 1993). Retroviral expression of a dominant negative mouse KDR (FLK-1) also inhibited tumour growth in mice (Millauer et al., *Nature*, 367, 576, 1993). Similarly, VEGF antisense (Cheng et al., *PNAS*, 93, 8502, 1996), anti-FLK-1 antibodies
30 (Witte et al., *Cancer Metast. Rev.*, 17, 155, 1998) and expression of soluble FLT-1 (Goldman et al., *PNAS*, 95, 8795, 1998) all inhibited tumour growth in mouse models.

Several pieces of experimental evidence suggest the biological effects of VEGF relating to angiogenesis are mediated predominantly through the KDR receptor (for review see Larrivee and Karsan, *Int. J. Mol. Med.*, 5, 447, 2000).

The VEGF-mediated activation of KDR alone (in cell lines expressing one
5 VEGFR-type only) was shown to be sufficient to cause cell proliferation and migration (Waltenburger et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 26988, 1994). Conversely, when FLT-1 alone is activated, cell proliferation is not seen and cell migration is inconsistently observed.

Experiments utilising receptor-selective VEGF mutants have shown that KDR
ligation activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) giving rise to proliferation,
10 migration and vascular permeability (Keyt et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 5638, 1996). The FLT-1 selective mutant was inactive in these assays.

An anti-VEGF Mab blocking the interaction with KDR but not FLT-1 was able to inhibit VEGF-induced vascular permeability, whereas a non-blocking anti-VEGF antibody had no effect (Brekken et al., *Cancer Res.*, 60, 5117, 2000).

15 The production of Mabs against the murine VEGF receptor, FLK-1, by hybridoma technology has been described (WO 94/11499). These were demonstrated to inhibit FLK-1 receptor activation by blocking the interaction of VEGF with the receptor. This inhibition of receptor activation was effective in inhibiting VEGF-induced angiogenesis in certain models. In addition, this anti-FLK-1 antibody has proven effective in treating several
20 mouse xenograft tumours. However, not all antibodies that bind FLK-1 will bind KDR with sufficient affinity for therapeutic efficacy.

VEGF-KDR binding also inhibits apoptosis of newly formed blood vessels via the KDR-mediated activation of the PI3-kinase-Akt kinase signalling pathways (Akt kinase is a well-known downstream kinase of the PI3-kinase pathway involved in cell survival,
25 Gerber et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 30336, 1998). Animal models also demonstrated the effectiveness of blockade of this anti-apoptotic response through blocking the VEGF-KDR interaction.

It is currently believed that KDR is the most important receptor in mediating the effects of VEGF and its role in promoting angiogenesis and new vessel survival appears
30 universally acknowledged.

Therefore, an antibody molecule able to bind KDR and block its activation by VEGF may be of therapeutic benefit in the treatment of pathologies in which VEGF and/or KDR are implicated. For example, cases of inflammation, psoriasis, rheumatoid arthritis

and tumour growth. There are also strong arguments that this may be best achieved through blocking its interaction with the KDR receptor. There is a need for such an antibody molecule which can be used repeatedly and produced easily and efficiently. There is also a need for an antibody molecule that has high affinity for KDR and low immunogenicity in humans.

In a first aspect, the present invention provides an antibody molecule having specificity for KDR, 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 1 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) for CDRH2 or as H3 in Figure 1 (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 and H3 (SEQ ID NO:1 to 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 KDR, 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 1 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, as L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or as L3 in Figure 1 (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 1 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) for CDRH2 or as H3 in Figure 1 (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 1

(SEQ ID NO:4) for CDRL1, as L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or as L3 in Figure 1 (SEQ ID NO:6) for CDRL3.

The CDRs given in SEQ ID NOS:1 to 6 (Figure 1) referred to above are derived from a mouse monoclonal antibody VR165. The present invention also provides the mouse
5 monoclonal antibody VR165. The sequences of the variable domains of the VR165 antibody are shown in Figure 2 (SEQ ID NOS: 7 and 8). The light chain constant region of VR165 is kappa and the heavy chain constant region is IgG2a. This mouse antibody is referred to below as "the donor antibody".

In a second alternatively preferred embodiment, the antibody according to either of
10 the first and second aspects of the present invention is a chimeric mouse/human antibody molecule, referred to herein as the chimeric VR165 antibody molecule. The chimeric VR165 antibody molecule comprises the variable domains of the mouse Mab VR165 (SEQ ID NOS:7 and 8) and human constant domains. Preferably, the chimeric VR165 antibody molecule comprises the human C kappa domain (Hieter et al., Cell, 22, 197-207, 1980;
15 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
20 molecule wherein the heavy and/or light chain contains one or more CDRs from the donor antibody (e.g. a murine Mab) 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.

25 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, TEL, LAY and POM (Kabat et al. (supra)). For example, KOL and NEWM can
30 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 heavy chain are the human germline group 3 framework regions shown in Figure 3 (VH3-7 GL, SEQ ID NO:9). The preferred

framework regions for the light chain are the human germline sequence group 1 framework regions shown in Figure 3 (A30 GL, SEQ ID NO:10).

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 germline group 3 framework regions (shown in Figure 3) (SEQ ID NO:9), then the acceptor framework regions of the heavy chain comprise, in addition to one or more donor CDRs, donor residues at positions 77 and 93 (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 3) (SEQ ID NO:10) then the acceptor framework regions of the light chain comprise donor residues at positions 36, 44, 60, 66, 69, 70 and 71 (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, di-Fab, a di-(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 light chain having the sequence given as SEQ ID NO:11 (Figure 4) and a heavy chain having the sequence given as SEQ ID NO:12 (Figure 5). The amino acid sequences given in SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12 are preferably encoded
5 by the nucleotide sequences given in SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14, respectively (Figure 4 and Figure 5).

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 of one or more amino acids to allow the attachment of an effector or reporter
10 molecule. Preferably, 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. Such a modified Fab fragment preferably has a light chain having the sequence given as SEQ ID NO:11 and the heavy chain having the sequence given as SEQ ID NO:12. The amino acid sequences given in SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12 are preferably encoded
15 by the nucleotide sequences given in SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14, respectively.

In a further alternative, it is particularly preferred that the antibody molecule of the present invention is a di-(modified Fab) fragment wherein the modification is the addition to the C-terminal end of each Fab heavy chain of one or more amino acids to allow the attachment of the chain to another such chain and to an effector or reporter molecule.
20 Preferably the additional amino acids form a modified hinge region containing one, two or three cysteine residues, for attachment to the other Fab, the effector or reporter molecules.

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

The polymer molecule may, in general, be a synthetic or a naturally occurring
25 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
30 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
5 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 40000Da and more preferably from 25000 to 40000Da. The polymer size may in
10 particular be selected on the basis of the intended use of the product.

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.

15 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 other effector or
20 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
25 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
30 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 93/06231, WO 92/22583, WO 90/09195 and WO 89/01476. 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 or di-Fab of the present invention is PEGylated (i.e. has PEG (poly(ethyleneglycol)) or mPEG (methoxypoly(ethyleneglycol)) covalently attached thereto) according to the methods disclosed in EP-A-0948544 and EP-A-1090037. Preferably the antibody molecule of the present invention is a PEGylated modified Fab fragment as shown in Figure 6 or a PEGylated di-(modified Fab) fragment. As shown in Figure 6, 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. Similarly each mPEG may be linked to a lysine residue covalently attached to a bis-maleimide linker as described in EP-A-1090037 to form a PEGylated di-(modified Fab) according to the invention.

Preferably, in the compound shown in Figure 6, the heavy chain of the antibody part has the sequence given as SEQ ID NO:12 and the light chain has the sequence given in SEQ ID NO:11.

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 KDR ligation by VEGF.

5 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
10 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 0.4×10^{-10} M. Preferably, the antibody molecule of the present invention comprises the
15 heavy chain variable domain gH3 (SEQ ID NO:15) and the light chain variable domain gL3 (SEQ ID NO:16). The sequences of the variable domains of these light and heavy chains are shown in Figure 7.

The present invention also relates to variants of the antibody molecule of the present invention, which have an improved affinity for KDR. Such variants can be
20 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
25 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, for example as described in the figures herein.

30 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.

5 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 pTTOD(CDP791) as shown schematically in Figure 8.

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
10 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
15 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.

20 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.

25 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, di-(modified Fab) and F(ab')₂ fragments, and especially Fv fragments and single chain antibody fragments, for example, single chain Fvs. Eukaryotic,
30 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 diagnostic composition or may be accompanied by other active ingredients including other antibody ingredients, for example anti-T cell, anti-IFN γ 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.

10 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
15 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.

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
20 depends on the nature of the condition to be treated, the degree to which the level of VEGF 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. The dose will also be selected according to the age and condition of the patient.

Thus, for example, where the product is for treatment or prophylaxis of a chronic
25 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
30 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.

5 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
10 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
15 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 in which VEGF and/or KDR are implicated.

20 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 in which VEGF and/or KDR are implicated.

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

For example, VEGF (and therefore KDR) has been implicated in a number of pathological conditions including inflammation, psoriasis, rheumatoid arthritis and tumour growth and metastasis.

30 The present invention also provides a method of treating human or animal subjects suffering from or at risk of a disorder in which VEGF and/or KDR are implicated, 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 KDR.

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 CDR sequences of the heavy and light chain V-regions of the VR165 mouse monoclonal antibody gene (SEQ ID NOS 1-6).

Figure 2 shows the protein sequence of mouse monoclonal antibody VR165 VH and VL domains (SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:8).

Figure 3 shows the V-region protein sequences chosen as human germline acceptor frameworks. VH3-7 GL is a human germline VH gene (SEQ ID NO:9). A30 GL refers to the human VL germline sequence A30 gene (SEQ ID NO:10). In each case the germline sequence of framework 4 is provided by the human germline J_H4 and J_K1 respectively.

Figure 4 shows the amino acid and nucleotide sequence of the CDP791 Fab light chain (SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:13).

Figure 5 shows the amino acid and nucleotide sequence of the CDP791 Fab heavy chain (SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:14).

Figure 6 shows the structure of a modified Fab fragment derived from antibody VR165 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 7 shows the protein sequences for the optimised CDR-grafted VH and VL domains gene (SEQ ID NO:15 and SEQ ID NO:16).

Figure 8 shows the optimised pTTOD(CDP791) plasmid which contains the IGS-2 variant between grafts gL3 and gH3.

Figure 9 shows the protein sequence of the designed VH and VL grafts (gH1-3 and gL1-3, SEQ ID NOS 17-22). Graft gH1 contains no murine framework residues. Graft gH2 contains murine residues at positions 77 and 93 (Kabat numbering). Both T and S are common in human germline sequences at position 77, so the inclusion of T is still consistent with a human residue. The V at position 93 is likely to be important at the VH/VL interface. The inclusion of the human residues at 60 and 62 represents the changes to the C-terminal portion of CDR-H2. Graft gL2 contains murine residues at positions 60,

66, 69, 70 and 71 (Kabat numbering). Graft gL3 contains additional murine residues at positions 36 and 44).

Figure 10 shows the design of genes encoding the gH1 and gL1 grafts (SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24).

5 Figure 11 shows the oligonucleotides used to assemble the genes encoding for the gL1 and gH1 grafts (SEQ ID NOS:25-40).

Figure 12 shows plasmids pCR2.1(gH1) and pCR2.1(gL1) which contain the gH1 and gL1 grafts, respectively.

10 Figure 13 shows oligonucleotide cassettes used in the construction of grafts gH2, gH3, gL2 and gL3 (SEQ ID NOS:41-44).

Figure 14 shows oligonucleotide pairs used in the construction of grafts gH2, gH3, gL2 and gL3 (SEQ ID NOS:45-52).

Figure 15 shows plasmids pGamma4 and pMR10.1 into which the VH and VL grafts, respectively, were sub-cloned to enable expression in CHO cell lines.

15 Figure 16 shows E.coli Fab' expression plasmid pTTOD, in this case containing the IGS-3 sequence.

Figure 17 shows the nucleotide sequence of the three IGS regions tested (SEQ ID NOS:53-55).

20 Figure 18 shows the results of the Fab' fermentation comparison of IGS performance.

Figure 19 shows the coding and flanking sequence of the CDP791 Fab' fragment (SEQ ID NO:56).

Figure 20 shows the radioimmunoassay results, in which the antibody fragments are tested for blocking of VEGF binding to KDR.

25 Figure 21 shows the amino acid sequence of the entire heavy chain of the gH3-grafted VR165-derived monoclonal antibody (SEQ ID NO:57).

EXAMPLES

Monoclonal Antibody production and selection

An in-house immunisation program was initiated to select an antibody to human KDR that potently blocks the interaction with its ligand VEGF. Mice were immunised with a variety of immunogens including CHO cells transfected with full length human KDR, purified human KDR-human Fc fusion proteins and DNA encoding these fusion proteins. From a total of 19 fusions from animals immunised with cellular/protein immunogens, and 4 fusions from animals immunised with DNA, approximately 23,000 wells were screened in a primary ELISA format for binding to human 7-domain KDR-Fc. About 800 antibodies were then subjected to a secondary screen, a radioimmunoassay measuring blocking of ¹²⁵I VEGF binding to human 7-domain KDR-Fc. A tertiary screen measured the blocking of VEGF stimulated Tissue Factor release from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). From this screening cascade, antibody VR165 was selected (data not shown).

Gene Cloning of VR165

RNA was prepared from hybridoma cells expressing VR165 and was reverse transcribed to DNA. This was then used as the template for a series of PCR reactions to amplify the V-region sequences. Degenerate primer pools designed to anneal within the conserved heavy and light chain signal sequences were used as forward primers, while primers encoding the framework 4 / C-region junction served as reverse primers. In this way, the V-region genes of both the heavy and light chain were amplified and then cloned and sequenced. The DNA sequences were translated to give the VR165 V-region amino acid sequence which was verified by reference to the protein sequence determined by N-terminal sequencing. The murine V-region genes were then sub-cloned into the expression vectors pMR10.1 and pGamma-4. These are separate vectors for expression of the light and heavy chain respectively containing genomic DNA encoding constant region genes for human kappa light chain and gamma-4 heavy chain. Co-transfection into CHO cells generates chimeric VR165 antibody.

Design of CDR-grafted sequences

VR165 was CDR-grafted onto human frameworks in order to reduce potential immunogenicity and to facilitate *E. coli* expression. Human germline acceptor frameworks were chosen from sub-group VHIII and VLI. The heavy chain acceptor framework is the human germline sequence VH3-7, with framework 4 coming from this portion of the human JH-region germline JH4. The light chain acceptor framework is the human germline sequence A30, with framework 4 coming from this portion of the human JK-region germline JK1. The alignment shows that there are 15 framework differences between the donor and acceptor heavy chains. At each of these positions an analysis was made of the potential of that residue to contribute to antigen binding; if considered important, the murine donor residue was retained. The light chain alignment shows that there are 24 framework differences between the donor and acceptor sequences. The potential of the murine residue to contribute to antigen binding was again analysed. In this way, three VH grafts were designed and three VL grafts (Figure 9, SEQ ID NOS:17-22). In each case graft 1 represents a graft without murine framework residues. Grafts 2 and 3 contain murine framework residues at the positions shown. Graft gH3 also contains additional human residues at the C-terminal end of CDR-H2. This portion of the CDR is not at the antigen binding surface. Genes were designed to encode the grafted sequences, using codons frequently used in *E. coli* genes and avoiding 'rare' *E. coli* codons (Wada et al., Nucl. Acids Res., 19, 1981-86, 1991). Restriction sites were introduced into the DNA sequence at intervals to facilitate further genetic manipulation. Figure 10 shows the design of genes for gH1 and gL1 (SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24). The oligonucleotides used to construct the genes are shown in figure 11 (SEQ ID NOS:25-40).

Construction of genes for grafted sequences

A PCR assembly technique was employed to construct the CDR-grafted gH1 and gL1 V-region genes. Reaction volumes of 100 μ l were set up containing 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.001% gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 1 pmole each of the 'internal' primers (F2, F3, F4, R2, R3, R4), 10 pmole each of the 'external' primers (F1, R1), and 1 unit of Taq polymerase (AmpliTaq, Applied BioSystems, catalogue no. N808-0171). PCR cycle parameters were 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute, for 30 cycles. The reaction products were then run on a 1.5% agarose gel, excised and recovered using QIAGEN spin columns (QIAquick

21

gel extraction kit, cat no. 28706). The DNA was eluted in a volume of 30 μ l. Aliquots (1 μ l) of the gH1 and gL1 DNA were then cloned into the InVitrogen TOPO TA cloning vector pCR2.1 TOPO (catalogue no. K4500-01) according to the manufacturer's instructions. This non-expression vector served as a cloning intermediate to facilitate
5 sequencing of a large number of clones. DNA sequencing using vector specific primers was used to identify correct clones containing gH1 and gL1, creating plasmids pCR2.1(gH1), and pCR2.1(gL1) (see Figure 12).

An oligonucleotide cassette replacement method was used to create the humanised
10 grafts gH2 and gL2. Figure 13 shows the design of the oligonucleotide cassettes (SEQ ID NO:41 and SEQ ID NO:43). To construct each variant, the vector (pCR2.1(gH1) or pCR2.1(gL1)) was cut with the restriction enzymes shown (Figure 13, restriction sites underlined), the large vector fragment was gel purified from agarose and was used in ligation with the oligonucleotide cassette. Figure 14 shows the sequences of the
15 oligonucleotides used in the cassettes (SEQ ID NOS:45-46 and SEQ ID NOS:49-50). Pairs were annealed together mixing at a concentration of 0.5 pmoles/ μ l in a volume of 200 μ l containing 12.5mM TrisHCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 0.25mM dithioerythritol, and heating to 95°C for 3 minutes in a waterbath (volume 500 ml) then allowed to slow-cool to room temperature. The annealed oligonucleotide cassette was then
20 diluted ten-fold in water before ligation into the appropriately cut vector. DNA sequencing was used to confirm the correct sequence, creating plasmids pCR2.1(gH2) and pCR2.1(gL2).

Variants gH3 and gL3 were constructed in similar fashion from gH2 and gL2. The
25 cassettes and oligonucleotides are shown in Figures 13 and 14 (SEQ ID NO:42 and SEQ ID NO:44, SEQ ID NOS:47-48 and SEQ ID NOS:51-52). Construction of gL3 required a modified strategy because of the existence of PvuI sites in the pCR2.1 vector backbone. Cleavage of pCR2.1(gL2) with AatII and SfuI created a vector molecule into which was ligated the PvuI-AatII annealed cassette plus a 225 base pair SfuI-PvuI fragment also
30 prepared from pCR2.1(gL2). DNA sequencing was used to confirm the correct sequence, creating plasmids pCR2.1(gH3) and pCR2.1(gL3).

Each of the 3 heavy chain grafts was then sub-cloned into the expression vector pGamma-4 as HindIII-ApaI fragments. Each of the 3 light chain grafts was sub-cloned into the light chain expression vector pMR10.1 as SfiI-BsiWI fragments. Figure 15 shows maps of these expression vectors. Antibodies were expressed transiently by co-transfection into CHO cells. All combinations of grafted chain and chimeric chain were expressed and compared against the double chimeric antibody.

Binding was assessed in a KDR binding ELISA, in a radioimmunoassay of inhibition of labeled VEGF binding to KDR and in a BIAcore assay of KDR binding. All the grafted forms performed well in the ELISA and radioimmunoassay, showing activity similar to the chimeric. From the BIAcore analysis, graft gL3gH3 was selected as the optimum (data not shown), and is henceforth referred to as g165.

Construction of plasmid pTTOD

Plasmid pTTO-1 was constructed as follows.

(a) Replacement of the pTTQ9 Polylinker

Plasmid pTTQ9 was obtained from Amersham. An aliquot (2 µg) was digested with restriction enzymes Sall 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. This sequence has cohesive ends which are compatible with the Sall and EcoRI ends generated by restriction of pTTQ9. By cloning this oligonucleotide 'cassette' into the pTTQ9 vector, the Sall 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 SphI 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 Sall / 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. 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.

(c) Production of Plasmid pTTOD

Plasmid pTTOD was derived from pTTO-1 by removal of backbone restriction sites for *PvuII* (3 sites), *EcoRV* (2 sites) and *Apal* (1 site). These changes were made to simplify Fab' coding strategies. In making these changes the coding protein sequence of the *lacI^q* gene and tetracycline resistance gene were not altered, although 'silent' changes were made at the DNA level. A PCR strategy was used, in which primers bearing 'silent' changes which removed these restriction sites were designed and used to amplify sections of the parent plasmid (pTTO-1). Flanking restriction sites (unaltered) were then used to replace sequences in the parent plasmid with these modified sequences. By this multi-stage process plasmid pTTOD was created. Transfer of existing Fab' genes within vector

pTTO into pTTOD was achieved using the unique PstI and EcoRI sites which flank the genes, creating pTTOD(Fab').

Insertion of g165 V-region genes into E. coli Fab' expression plasmid pTTOD

5 The starting point for insertion of g165 sequences was 3 vectors for expression of an irrelevant Fab', pTTOD(Fab' IGS-1), pTTOD(Fab' IGS-2) and pTTOD(Fab' IGS-3) (for example, see Figure 16). These differ only in the so-called IGS or intergenic sequence which separates the light chain gene from the heavy chain gene. These IGS regions are shown in Figure 17 (SEQ ID NOS:53-55). Cloning of the g165 sequences into these
10 vectors was performed as a 2-stage process. First the light chain was restricted from pCR2.1(gL3) as a EcoRV-BsiWI fragment (395 bp) and inserted into the large vector fragment from EcoRV-BsiWI digestion of pTTOD(Fab' IGS-1), pTTOD(Fab' IGS-2) and pTTOD(Fab' IGS-3). This created the cloning intermediates pTTOD(g165L IGS-1), pTTOD(g165L IGS-2) and pTTOD(g165L IGS-3). These cloning intermediates were then
15 cut with PvuII and ApaI, the large vector fragment was purified and the 435 bp PvuII-ApaI fragment from pCR2.1(gH3) was inserted. This created the 3 Fab' expression plasmids pTTOD(g165 IGS-1), pTTOD(g165 IGS-2) and pTTOD(g165 IGS-3).

 These plasmids were transformed into the host strain W3110 and expression of
20 Fab' by these 3 plasmids was compared in shake flasks and in the fermenter. Figure 18 shows the results of a fermenter comparison, clearly demonstrating the superior performance of the IGS-2 variant.

 Plasmid pTTOD(g165 IGS-2) was retermed pTTOD(CDP791). The plasmid map
25 of this construct is shown in Figure 8. Figure 19 shows the full DNA and protein sequence of the coding region of the Fab' in this vector, plus some of the 5' and 3' flanking sequence (SEQ ID NO:56).

PEGylation of CDR-Grafted, VR165-based Modified Fab

30 The purified modified Fab is site-specifically conjugated with a branched molecule of mPEG. This is achieved by activation of a single cysteine residue in a truncated hinge region of the modified Fab, followed by reaction with (mPEG)-lysyl maleimide as previously described (A.P. Chapman et al., Nature Biotechnology 17, 780-783, 1999). The

PEGylated molecule is shown in Figure 6. Alternatively, reaction of the activated Fab with (mPEG)-lysyl bis-maleimide as described in EP-A-1090037 yields a PEGylated di-(modified Fab), hereinafter referred to as DFM.

5 BIAcore activities of naked and PEGylated fragments

7 Ig-domain human KDR fused to human Fc was captured on a chip coated with anti-Fc, and the various fragments of the CDR grafted antibody g165 and the murine parent antibody VR165 were passed over permitting affinity determination. The table below summarises the results obtained. In this assay format, there is an advantage of divalency as
10 shown by the lower off rates (K_d) of the divalent species. The affinity of the grafted DFM is very similar to the murine IgG, with the DFM-PEG showing a minor reduction of affinity. The KD of the g165 DFM-PEG molecule is approximately 4×10^{-11} M in this assay.

15 Table 1: BIAcore activities of naked and PEGylated fragments

a-KDR	$K_a \text{ e}^5$	$K_d \text{ e}^{-4}$	$K_D \text{ e}^{-10}$
DFM	21.6	0.64	0.29
DFM-PEG40	15.5	0.64	0.41
mIgG	19.8	0.60	0.30
FAB	13.6	12.4	9.1
FAB-PEG40	11.0	11.8	10.7

Radioimmunoassay

The ability of the fragments to block VEGF binding to KDR was measured in a radioimmunoassay. Polyclonal anti Fc was used to capture 7 Ig-domain KDR fused to human Fc in a microtitre plate, antibody or fragment was added followed by ¹²⁵I labeled VEGF-165. Results of this assay are shown in Figure 20. Again in this assay set-up there is an advantage of divalency, demonstrated by the superior blocking performance of the DFM over the Fab'. The DFM-PEG construct shows a minor reduction of activity compared to the naked DFM, as was seen in the BIAcore study.

10

Cell based assays

The molecule g164 DFM PEG also demonstrated activity in cell based assays. Its ability to block VEGF stimulation of KDR was demonstrated via inhibition of tissue factor release by human umbilical vein endothelial cells (see Clauss et al., J. Biol. Chem., 271, 17629-17634, 1996). Activity was also demonstrated via inhibition of VEGF mediated Ca²⁺ mobilisation in human microvascular endothelial cells (see Cunningham et al., Am. J. Physiol., 276, C176-181, 1999).

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.

20

CLAIMS

1. An antibody molecule having specificity for human KDR, comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given as H1 in Figure 1 (SEQ ID NO:1) for CDRH1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) or as H3 in Figure 1 (SEQ ID NO:3) for CDRH3.
2. An antibody molecule having specificity for human KDR, comprising a light chain wherein the variable domain comprises a CDR having the sequence given as L1 in Figure 1 (SEQ ID NO:4) for CDRL1, as L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDRL2 or as L3 in Figure 1 (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 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 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 is a CDR-grafted antibody molecule.
6. The antibody molecule of claim 5, wherein the variable domain comprises human acceptor framework regions and non-human donor CDRs.
7. The antibody molecule of claim 6, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the heavy chain are based on a human germline group 3 framework sequence and comprise non-human donor residues at positions 77 and 93.

8. The antibody molecule of claim 6 or claim 7, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the light chain are based on human germline group 1 framework sequence and comprise non-human donor residues at positions 36, 44, 60, 66, 69, 70 and 71.

5

9. The antibody molecule of any one of claims 1 to 8, comprising the heavy chain variable region gH3 (SEQ ID NO:15) and light chain variable region gL3 (SEQ ID NO:16).

10 10. The antibody molecule of any one of claims 1 to 9 which is a Fab fragment.

11. The antibody molecule of claim 10, which is a Fab fragment comprising a light chain having the sequence given in SEQ ID NO:11 and a heavy chain having the sequence given in SEQ ID NO:12.

15

12. The antibody molecule of any one of claims 1 to 9, 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.

20 13. The antibody molecule of claim 12, 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.

14. The antibody molecule of claim 12, which is a modified Fab or di-Fab fragment
25 comprising a light chain having the sequence given in SEQ ID NO:11 and a heavy chain having the sequence given in SEQ ID NO:12.

15. An antibody molecule having specificity for human KDR, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:11.

30

16. An antibody molecule having specificity for human KDR, having a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:57

17. An antibody molecule having specificity for human KDR, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:12 and a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:57
- 5 18. A variant of the antibody molecule of any one of claims 1 to 17, which has an improved affinity for KDR.
19. The variant of claim 18 which is obtained by an affinity maturation protocol.
- 10 20. The antibody of any one of claims 1 to 4 which is murine anti-KDR monoclonal antibody VR165.
21. The antibody molecule of any one of claims 1 to 4, which is a chimeric antibody molecule comprising the light and heavy chain variable domains of the monoclonal
15 antibody of claim 26.
22. A compound comprising the antibody molecule of any one of claims 10 to 14 having covalently attached to an amino acid at or towards the C-terminal end of its heavy chain an effector or reporter molecule.
- 20 23. The compound of claim 22, which comprises an effector molecule.
24. The compound of claim 23, wherein the effector molecule comprises one or more polymers.
- 25 25. The compound of claim 24, 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.
- 30 26. The compound of claim 25, wherein the one or more polymers is/are a methoxypoly(ethyleneglycol).

27. A compound comprising the antibody molecule of claim 12 having attached to one of the cysteine residues at the C-terminal end of the heavy chain a lysyl-maleimide or lysyl bis-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.
- 5
28. A DNA sequence which encodes the heavy and/or light chain of the antibody molecule of any one of claims 1 to 21.
29. A cloning or expression vector containing the DNA sequence of claim 27.
- 10
30. An E. coli expression vector comprising the DNA sequence of claim 27.
31. The E. coli expression vector of claim 30 which is pTTOD(CDP791).
- 15
32. A host cell transformed with the vector of any one of claims 29 to 31.
33. A process for the production of the antibody molecule of any one of claims 1 to 21, comprising culturing the host cell of claim 32 and isolating the antibody molecule.
- 20
34. A process for the production of the antibody molecule of any one of claims 1 to 21, comprising culturing E. coli comprising an E. coli expression vector comprising the DNA sequence of any one of claims 29 to 31 and isolating the antibody molecule.
35. The process of claim 34 wherein the antibody molecule is targeted to the periplasm.
- 25
36. A therapeutic or diagnostic composition comprising the antibody molecule of any one of claims 1 to 21 or the compound of any one of claims 23 to 27.
37. The antibody molecule of any one of claims 1 to 21, having specificity for human
- 30 KDR, or the compound of any one of claims 23 to 27, for use in treating a pathology in which VEGF and/or KDR are implicated.

38. The antibody molecule of or compound claim 37, for use in treating inflammation, psoriasis, rheumatoid arthritis and tumour growth or metastasis.

39. Use of the antibody molecule of any one of claims 1 to 21, having specificity for
5 human KDR, or the compound of any one of claims 23 to 27 in the manufacture of a medicament for the treatment of a pathology in which VEGF and/or KDR are implicated.

40. The use of claim 39, wherein the pathology is inflammation, psoriasis, rheumatoid arthritis and tumour growth or metastasis.

10

41. The vector pTTOD(CDP791) as shown in Figure 8.

Figure 1: Sequence of CDRs of VR165

Heavy Chain

H1 SYGMS	(SEQ. ID. NO. 1)
H2 TITSGGSYTYYPDTVKG	(SEQ. ID. NO. 2)
H3 IGEDALDY	(SEQ. ID. NO. 3)

Light Chain

L1 RASQDIAGSLN	(SEQ. ID. NO. 4)
L2 ATSSLDS	(SEQ. ID. NO. 5)
L3 LQYGSFPPT	(SEQ. ID. NO. 6)

Figure 2: Protein sequence of mouse monoclonal antibody VR165 variable domains**Heavy Chain (SEQ. ID. NO. 7)**

VR165 EVQLVESGGDLVKPGSLKLSCAASGFTFSYGMSSWVRQTPDKRLQWVATITSGGSYTYYPDTVKQ

VR165 RFTISRDNAEENTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRIGEDALDYWGQGTSTVTVSS

Light Chain (SEQ. ID. NO. 8)

VR165 DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIAGSLNWLREQPDGTIKRLIYATSSLD

VR165 GVPKRFSGSRSSQSDYSLTISSESEDFVDYYCLQYGSFPPITPGGGSKLEIKR

Figure 3: Comparison of VR165 V-region to Chosen framework V-regions

Seq. Id. No. 9: VH3-7 GL V-region

VH3-7 GL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTTFSSY	YHNSWVRQAPGK	GLEWVANIKQDGSEKYYVDSVAG
VR165	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLS	CAASGFTTFSSY	GNWVRQTPDKRLQWVATITSGGSY	TTYTPDIVKG
VH3-7 GL	RFTISRDNAKNSLYIQMNSL	RAEDTAVYYCAR	WGQGT	LVTVSS
VR165	RFTISRDNAE	NTLYIQMSSLSK	SEDTAMYYCVRI	GEDALDYWGQGT
				SVTVSS

Seq. Id. No.10: A30 GL V-region

A30 GL	DIQNTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGI	RNDLGWYQQKPK	KPLIYAASSLQS
VR165	DIQNTQSPSSLSASLGE	KVSLTCRASQD	IAGSLWMLRQEPD	GTIKALIYATSSLDS
A30 GL	GVPSRFSGSGSGTEFT	LTISSLPEDFATYYC	LQHN	SYP FGQGTKVEIKR
VR165	GVPKRFSGSRSGSDY	SLTISSLESEDFVD	YYCLQYCSFPPT	FGGGSKLEIKR

Figure 4: Light Chain, Including signal sequences

(Seq. Id. No. 13) ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT

(Seq. Id. No. 11) M K K T A I A I A>

(Seq. Id. No. 13) GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA

(Seq. Id. No. 11) V A L A G F A T V A Q A D I Q N T Q S>

(Seq. Id. No. 13) CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCS CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA

(Seq. Id. No. 11) P S S L S A S V G D R V T I T C R A S>

(Seq. Id. No. 13) CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC

(Seq. Id. No. 11) Q D I A G S L N W L Q Q K P G K A I K>

(Seq. Id. No. 13) CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG

(Seq. Id. No. 11) R L I Y A T S S L D S G V P K R F S G>

(Seq. Id. No. 13) AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG

(Seq. Id. No. 11) S R S G S D Y T L T I S S L Q P E D P>

(Seq. Id. No. 13) GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA

(Seq. Id. No. 11) A T Y Y C L Q Y G S F P P T F G Q G T>

(Seq. Id. No. 13) AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA

(Seq. Id. No. 11) K V E I K R T V A A P S V F I F P P S>

(Seq. Id. No. 13) GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA

(Seq. Id. No. 11) D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y>

(Seq. Id. No. 13) CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AGG

(Seq. Id. No. 11) P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S>

(Seq. Id. No. 13) CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG

(Seq. Id. No. 11) Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T>

(Seq. Id. No. 13) CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG

(Seq. Id. No. 11) L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T>

(Seq. Id. No. 13) CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT

(Seq. Id. No. 11) H Q G L S S P V T K S F N R G E C *>

Figure 5: Heavy Chain, Including signal sequences

(Seq. Id. No. 14) ATG AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
 (Seq. Id. No. 12) H K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q>

(Seq. Id. No. 14) GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG
 (Seq. Id. No. 12) A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L>

(Seq. Id. No. 14) CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC GGT ATG TCC TGG GTG
 (Seq. Id. No. 12) R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V>

(Seq. Id. No. 14) CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT ACG TCC GGA GGC AGC
 (Seq. Id. No. 12) R Q A F G K G L E W V A T I T S G G S>

(Seq. Id. No. 14) TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA
 (Seq. Id. No. 12) Y T Y Y V D S V K G R F T I S R D N A>

(Seq. Id. No. 14) AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT
 (Seq. Id. No. 12) K N T L Y L Q N N S L R A E D T A V Y>

(Seq. Id. No. 14) TAC TGT GTA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG
 (Seq. Id. No. 12) Y C V R I G E D A L D Y W G Q G T L V>

(Seq. Id. No. 14) ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
 (Seq. Id. No. 12) T V S S A S T K G P S V F P L A P S S>

(Seq. Id. No. 14) AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
 (Seq. Id. No. 12) K S T S G G T A A L G C L V K D Y F F>

(Seq. Id. No. 14) GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC
 (Seq. Id. No. 12) E F V T V S W N S G A L T S G V H T F>

(Seq. Id. No. 14) CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
 (Seq. Id. No. 12) P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P>

(Seq. Id. No. 14) TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
 (Seq. Id. No. 12) S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S E>

(Seq. Id. No. 14) ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC
 (Seq. Id. No. 12) T K V D K K V E F K S C D K T K T C A>

(Seq. Id. No. 14) GCG TGA
 (Seq. Id. No. 12) A *>

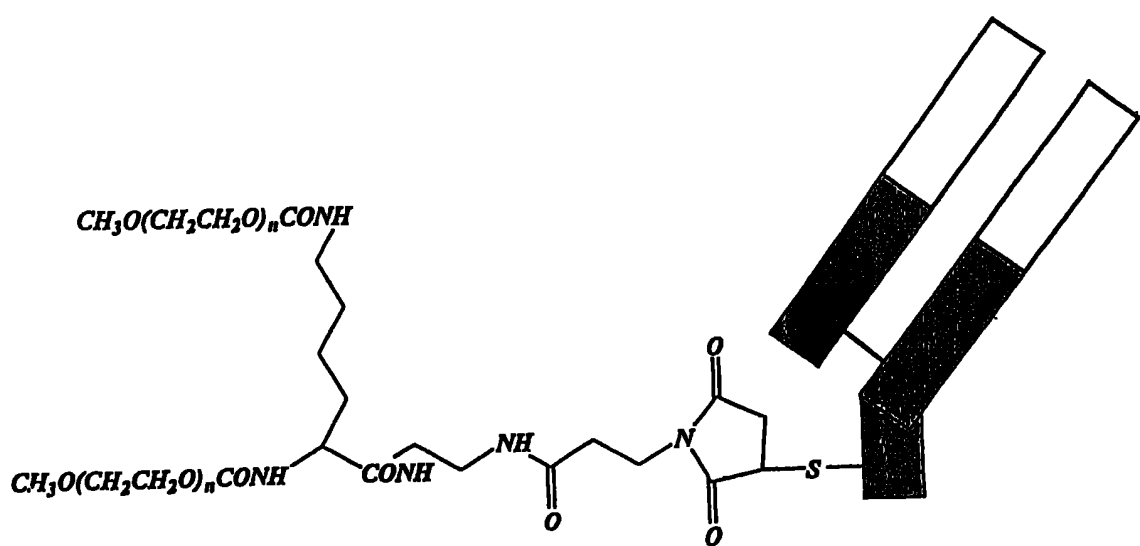


FIGURE 6

Figure 7:**gH3 (SEQ ID NO: 15)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATT
SGGSYTYYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDAL
DYWGQGTLVTVSS

gL3 (SEQ ID NO: 16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDIAGSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSL
DSGVPKRFSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

Figure 8: pTTOD(CDP791)

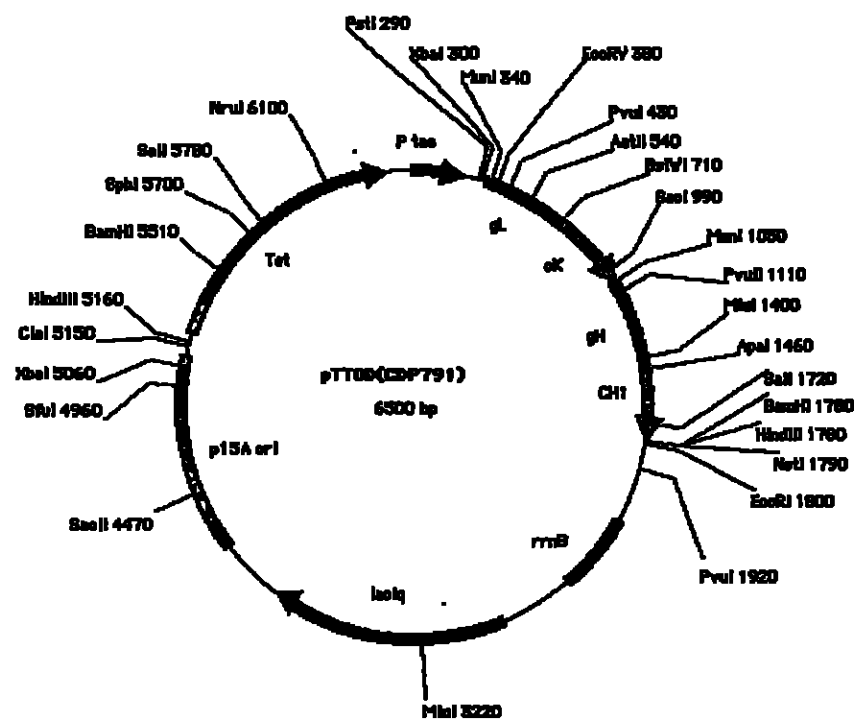


Figure 9: Protein sequence of the designed VH and VL grafts

Heavy Chain

(Seq.Id.No. 17)

gH1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH1 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIGEDALDYWGQGTLVTVSS

(Seq.Id.No. 18)

gH2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH2 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLVTVSS

(Seq.Id.No. 19)

gH3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDSVKG
gH3 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLVTVSS

Light Chain

(Seq.Id.No. 20)

gL1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNHWYQOKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL1 GVPKRFSGSRSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKEIKR

(Seq.Id.No. 21)

gL2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNHWYQOKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL2 GVPKRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKEIKR

(Seq.Id.No. 22)

gL3 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNHWYQOKPGKAIKRLIYATSSLDS
gL3 GVPKRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKEIKR

Figure 10: Gene design

gH1 sequence (SEQ ID NO:23)

HindIII 20 30 40 50 60
GATTAAGC TTGCCGCCAC C ATG AAG ATG TGG TTA AAC TGG GTT TTC CTT GCC CTC ATT
CTTATTTCG AACGCCGGTG G TAC TTC TAC ACC AAT TTG ACC CAA AAG GAA CGG GAG TAA
M K M W L E W V F L A L I>
70 80 PvuII 100 110
TTA AAA GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG
AAT TTT CCA CAG GTC ACA CTC CAC GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC
L K G V Q C E V Q L V E S G G L V Q>
120 130 140 150 160 170
CCT GGA GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCT TCT TAC
GGA CCT CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG
P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y>
180 190 200 210 220 230
GGT ATG TCC TGG GTG CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT
CCA TAC AGG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA
G M S W V R Q A P G K G L E W V A T I>
BspEI 250 260 270 280
ACG TCC GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC CCG GAC ACC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT
TGC AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG GGC CTG TGG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA
T S G G S Y T Y Y P D T V E G R F T I>
290 XbaI 300 310 320 330 340
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT AGC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TCG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
S R D N A K N S L Y L Q M W S L R A E>
350 360 370 380 MluI 390 400
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GCA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CGT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC CTG ATG ACC CCT
D T A V Y Y C A R I G E D A L D Y W G>
410 420 430 440 ApaI 450
CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA AGA AA
GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT TCT TT
Q G T L V T V S S A S T K G F>

gL1 sequence (SEQ ID NO:24)

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

350	360	370	380	390	400
CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA					
GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT					
L Q Y G S F P P T F G Q G T K V E I E>					

SeqWI 410
CGT ACG GC GTGC
GCA TGC CG CACG
R T>

Figure 11: Oligonucleotides for gene assembly**gL1 F1 (SEQ ID NO:25)**

GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

gL1 F2 (SEQ ID NO:26)TCCAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTG
TGACTATTACCTGTC**gL1 F3 (SEQ ID NO:27)**CAAAAACCGGGCAAAGCCCCCAAGCGCCTCATCTATGCGACGTCCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCATCTCG
TTTCAGTGGCAGTGGC**gL1 F4 (SEQ ID NO:28)**AGATTTCTGCCACTTACTATTGTCTGCAATATGGCAGCTTCCCTCCGACCTTCGGTCAGGGCACTAAAGTAGA
AATCAAACGTACGGCGTGC**gL1 R1 (SEQ ID NO:29)**

GCACGCCGTACGTTTGATTTT

gL1 R2 (SEQ ID NO:30)GACAATAGTAAGTGGCGAAATCTTCCGGCTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTAAATTCAGTACCGCTGCCA
CTGCCACTGAAACGAG**gL1 R3 (SEQ ID NO:31)**GGGGCTTTGCCCGGTTTTTGCTGATACCAGTTTCAAGGCTACCCGCGATGTCCTGACTGGCACGACAGGTAAT
AGTCACACGATC**gL1 R4 (SEQ ID NO:32)**GATATCACATCTGGTACCTGGAAACAAGAGCAACAAGAAGCCAAGAATCTGAGCAGGGGTCCTCATGGTGG
CGGCTTCGAATCATCC**gH1 F1 (SEQ ID NO:33)**

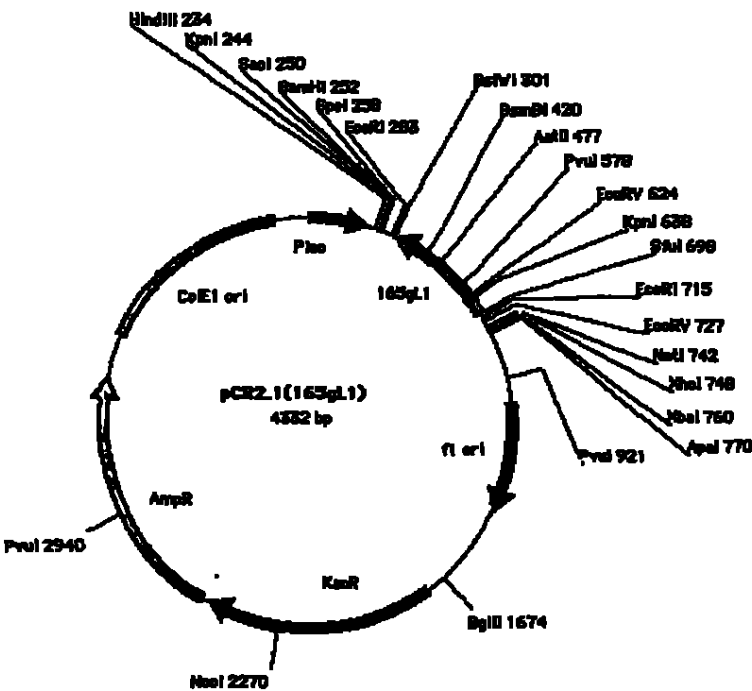
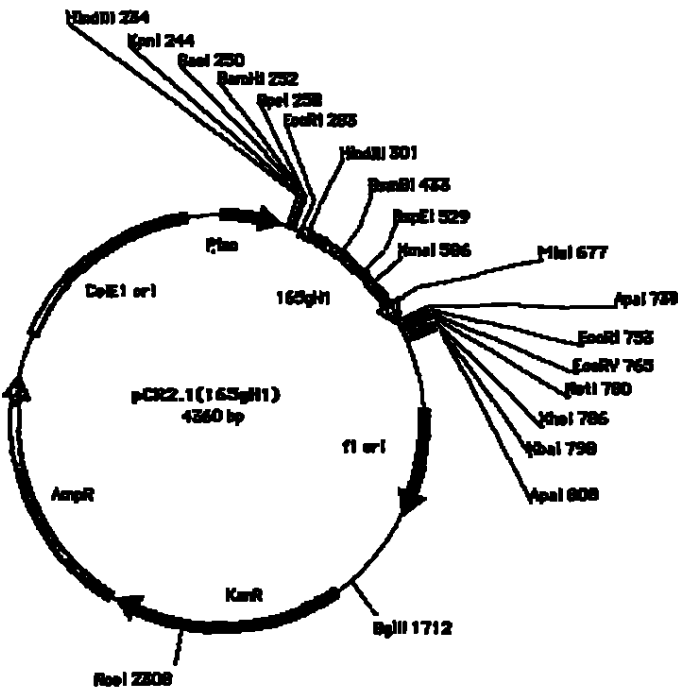
GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

gH1 F2 (SEQ ID NO:34)TCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
TTGTGCAGCAAGCGGCTTAC**gH1 F3 (SEQ ID NO:35)**AGTGGGTGGCAACCATTACGTCCGGAGGCAGCTATACATACTACCCGGACACCGTCAAGGGCCGTTTCACC
ATTTCCCGGGACAATGCAA**gH1 F4 (SEQ ID NO:36)**CTATTACTGTGCACGGATCGGCCAAGACGCGTTGGACTACTGGGGACAGGGGACCCTTGTGACAGTCTCCT
CTGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA**gH1 R1 (SEQ ID NO:37)**

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

gH1 R2 (SEQ ID NO:38)CCGATCCGTGCACAGTAATAGACTGCTGTGTCCTCTGCGCGGAGAGAGTTCATCTGGAGGTAAAGGCTATT
CTTTGCATTGTCCCGGGAATGG**gH1 R3 (SEQ ID NO:39)**ACGTAATGGTTGCCACCCACTCCAGGCCCTTCCCAGGTGCCTGCCGCACCCAGGACATACCGTAAGAGGAA
AAGGTGAAGCCGCTTGCTGCACA**gH1 R4 (SEQ ID NO:40)**CAGCTGCACCTCACACTGGACACCTTTTAAATGAGGGCAAGGAAAACCCAGTTTAACCACATCTTCATGGT
GGCGGCAAGCTTTTATTC

Figure 12: Plasmid pCR2.1(gH1) and pCR2.1(gL1)



40

Figure 13: Oligonucleotide cassettes for construction of gH2, gH3, gL2, gL3

gH2 cassette (SEQ ID NO: 41)

XbaI 10 20 30 40 50
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
S R D N A K N T L Y L Q N N S L R A E>
60 70 80 90 MluI
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GTA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CCG AAC
D T A V Y Y C V R I G E D A L>

gH3 cassette (SEQ ID NO:42)

BspEI 10 20 30 40 50
TCC GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC
AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG
S G G S Y T Y Y V D E V K G R F T I S>
XbaI
CGG GAC
GCC CTG
R D>

gL2 cassette (SEQ ID NO:43)

AatII 10 20 30 40 50
GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC AGT CGC AGC GGT
CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG TCA GCG TCG CCA
A T S S L D S G V P K R F S G S R S G>
60 70 80 BamBI 90
TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG
AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC
S D Y T L T I S S L Q>

gL3 cassette (SEQ ID NO:44)

PvuI 10 20 30 40 50
GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC
CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CCG TCA GTC CTG TAG CCG CCA TCG GAC TTG
G D R V T I T C R A S Q D I A G S L E>
60 70 80 90 100 AatII
TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC
ACC AAC GTC GPT TTT GGC CCG TTT CCG TAG TTC GCG GAG TAG ATA CCG TGC AGG
W L Q Q K P G K A I K R L I Y A T S>

Underlined residues represent changed amino acids compared to the parent sequence.

Figure 14: Oligonucleotides pairs for gH2, gH3, gL2, gL3 construction**gH2T (SEQ ID NO:45)****CCGGGACAATGCAAAGAATACCCTTTACCTCCAGATGAACTCTCTCCGCGCAGAGGACACAGCAGT
CTATTACTGTGTACGGATCGGCCAAGA****gH2B (SEQ ID NO:46)****CGCGTCTTCGCCGATCCGTACACAGTAATAGACTGCTGTGTCTCTGCGCGGAGAGAGTTTATCTG
GAGGTAAAGGGTATTCTTTGCATTGTC****gH3T (SEQ ID NO:47)****CCGGAGGCAGCTATACATACTACGTGGACAGCGTCAAGGGCCGTTTCACCATTTC****gH3B (SEQ ID NO:48)****CCGGGAAATGGTGAAACGGCCCTTGACGCTGTCCACGTAGTATGTATAGCTGCCT****gL2T (SEQ ID NO:49)****CCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCAAAACGTTTCAGTGGCAGTCGCAGCGGTTCTGACTATACCCTC
ACAATTTCTGTCTCT****gL2B (SEQ ID NO:50)****CTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTATAGTCAGAACCGCTGCGACTGCCACTGAAACGTTTTGGCA
CACCGCTATCCAGGCTGGACGT****gL3T (SEQ ID NO:51)****CGTGTGACTATTACCTGTCGTGCCAGTCAGGACATCGCGGGTAGCCTGAACTGGTTGCAGCAAAA
ACCGGGCAAAGCCATCAAGCGCCTCATCTATGCGACGT****gH3B (SEQ ID NO:52)****CGCATAGATGAGGCGCTTGATGGCTTTGCCCGGTTTTTGCTGCAACCAGTTCAGGCTACCCGCGAT
GTCCTGACTGGCACGACAGGTAATAGTCACACGAT**

42

Figure 15: CHO expression plasmids

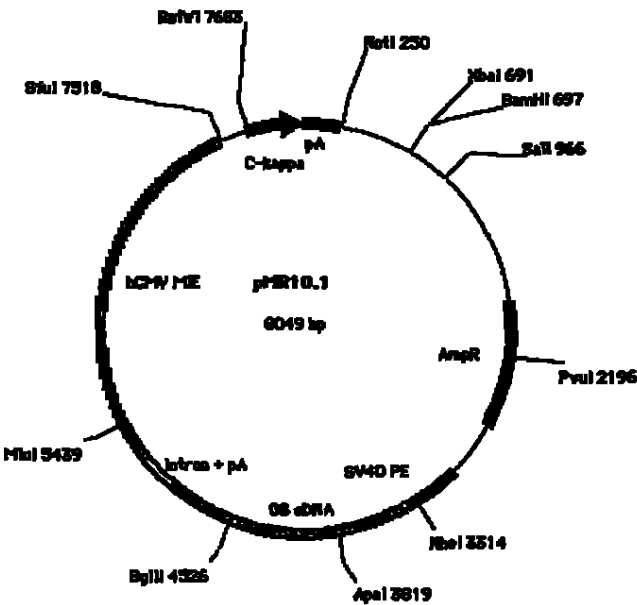
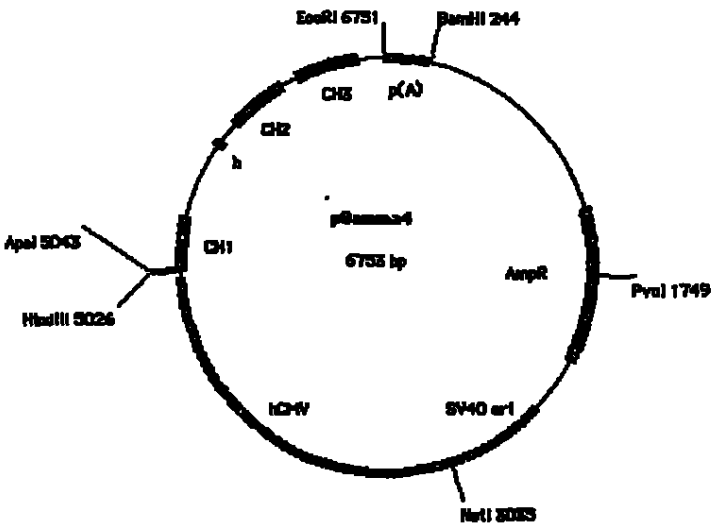


Figure 16: pTTOD(Fab' IGS-3) map

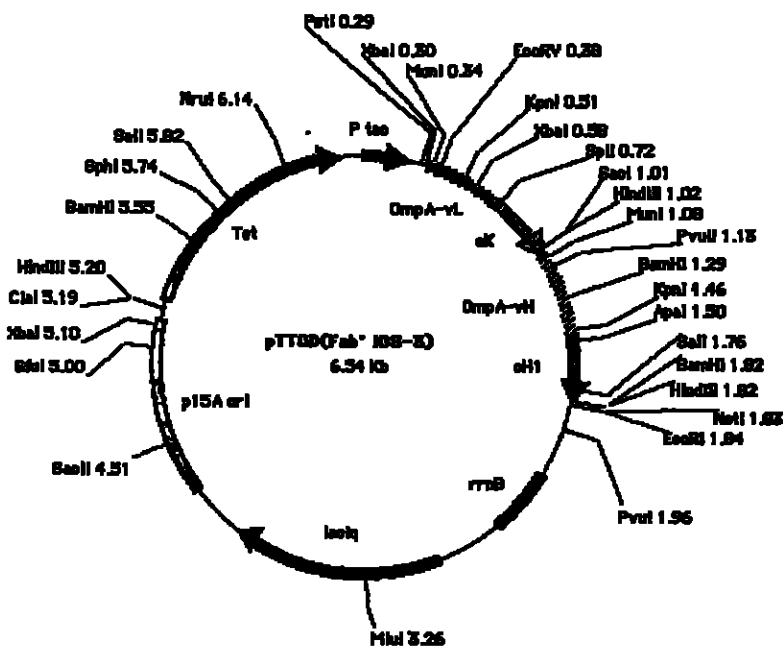


Figure 17: IGS Sequences

(SEQ ID NO:53)

IGS-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
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 ->

(SEQ ID NO:54)

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

(SEQ ID NO:55)

IGS-3; Intergenic space = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAAAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G
S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

~~gk~~

25

Figure 18: Fermentation of Fab'

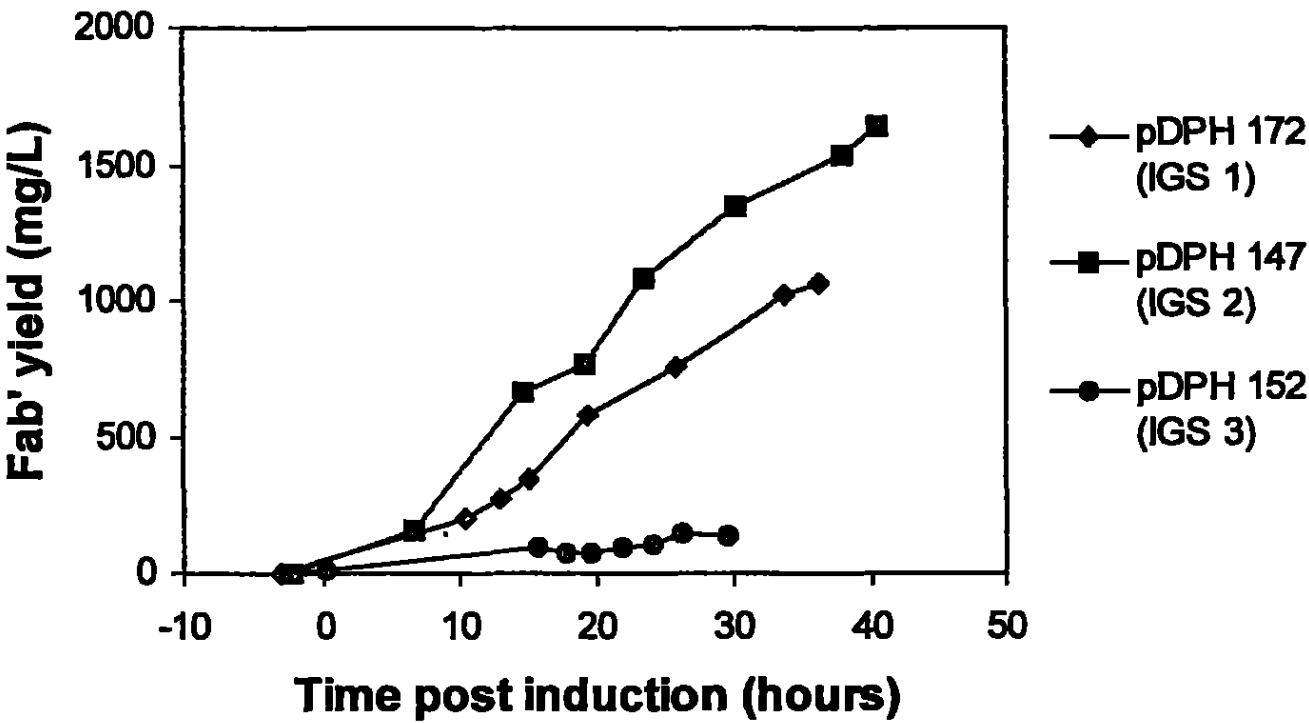


Figure 19: Coding and flanking sequence of CDP791 Fab' (SEQ ID NO:56)

```

      10      20      30      40      50      60      70
AATTCTCATG TTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT CTGGCGTCAG GCAGCCATCG
TTAAGAGTAC AAATGTCGA ATAGTAGCTG ACGTCCACG TGGTTACGAA GACCGCAGTC CGTCGGTAGC

      80      90     100     110     120     130     140
GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCGTT
CTTCGACACC ATACCGACAC GTCCAGCAIT TAGTGACGTA TTAAGCACAG CGAGTTCCGC GTGAGGGCAA

      150     160     170     180     190     200     210
CTGGATAATG TTTTTCGCG CGACATCATG ACGGTTCTGG CAAATATTCY GAAATGAGCT GTTGACAATT
GACCTATTAC AAAAAACGCG GCTGTAGTAT TGCCAAGACC GTTATANGA CTTTACTCGA CAACTGTTAA

      220     230     240     250     260     270     280
AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGNATTG TCGACGGATA ACAATTCAC ACAGGAACA GCGATGAGCT
TTAGTAGCCG AGCATATTAC ACACCTAAC ACTCGCCTAT TGTAAAGTG TGTCTTTGT CGCTACTCGA

      290     300     310     320     330     340
TGGCTGCAGG TCGAGTTCTA GATAACGAGG CGTAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
ACCGACGTCC AGCTCAAGAT CTATTGCTCC GCATTTT TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT
                                     M K K T A I A I A>

      350     360     370     380     390     400
GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA
V A L A G F A T V A Q A D I Q M T Q S>

      410     420     430     440     450
CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA
P S S L S A S V G D R V T I T C R A S>

460      470     480     490     500     510
CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC
Q D I A G S L M W L Q Q K P G K A I K>

      520     530     540     550     560     570
CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
GCG GAG TAG ATA CGC TCG AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG
R L I Y A T S S L D S G V P K R F S G>

      580     590     600     610     620     630
AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG
S R B G S D Y T L T I S S L Q P E D F>

      640     650     660     670     680
GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA
A T Y Y C L Q Y G S F P P T F G Q G T>

      690     700     710     720     730     740
AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CCG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA
K V E I K R T V A A P S V F I F P P S>

      750     760     770     780     790     800
GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y>

      810     820     830     840     850
CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AAG
P R E A K V Q W K V D N A L Q S G M S>

860      870     880     890     900     910
CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T>
```

27

920 930 940 950 960 970
CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG
L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T>
ND

980 990 1000 1010 1020 1030
CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA A ATG
GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT T TAC
H Q G L S S P V T K S F H R G E C +>

1040 1050 1060 1070 1080
AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CCG GAT CGA CCA AAG CCG TGG CAC GCG GTT
K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG
CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC
A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC GGT ATG TCC TGG GTG
GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG CCA TAC AGG ACC CAC
R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V>

1210 1220 1230 1240 1250
CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT ACG TCC GGA GGC AGC
GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA TGC AGG CCT CCG TCG
R Q A P G K G L E W V A T I T S G G S>

1260 1270 1280 1290 1300 1310
TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA
ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT
Y T Y Y V D S V K G R F T I S R D N A>

1320 1330 1340 1350 1360 1370
AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT
TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAG ATA
K N T L Y L Q M W S L R A E D T A V Y>

1380 1390 1400 1410 1420
TAC TGT GTA CCG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG
ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CCG AAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC
Y C V R I G E D A L D Y W G Q G T L V>

1430 1440 1450 1460 1470 1480
ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG
T V S S A S T K G P S V F P L A P S S>

1490 1500 1510 1520 1530 1540
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
ATG TCG TGG AGA CCC CCG TGT CCG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG
K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P>

1550 1560 1570 1580 1590 1600
GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC
CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CCG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F>

1610 1620 1630 1640 1650
CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG
P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P>

1660 1670 1680 1690 1700 1710
TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
AGG TCG TCG AAC CCG TGG GTC TGG ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG
S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N>

1720 1730 1740 1750 1760 1770
ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TCG GCG
TGG TTC CAG CTG TTC TTT CAA CTC GCG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT AGC CCC
T K V D K K V E P K S C D K T H T C A>

48

1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
GCG TGA TGA GGATCCAAAGC TTGCGGGCCGC GAATTCACATG GCCGTCGTTT TACAACGTCG TGACTGGGAA
CGC ACT ACT CCTAGGTTTCG AACGCCGGCG CTTAAGTGAC CGGCAGCAAA ATGTTGCAGC ACTGACCCCT
A *>

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910
AACCCTGGCG TTACCCAACT TAATCGCCTT GCAGCACATC CCCCTTTCGC CAGCTCGCGT AATAGCGAAG
TTGGGACCCG AATGGGTTGA ATTAGCGGAA CGTCGTGTAG GGGGAAAGCG GTCGAGCGCA TTATCGCTTC

1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
AGGCCCGCAC CGATCGCCCT TCCCAACAST TCGCGAGCCT GAATGGCGAA TGGCGCCTGA TCGGTAATT
TCCGGGCGTG GCTAGCGGGA AGGGTTGTCA ACGCGTCGGA CTTACCGCTT ACOGCGGACT ACGCCATAAA

1990 2000
TCTCCTTACG CATCTGTGCG
AGAGGAATGC GTAGACACGC

Figure 20: Radioimmunoassay Results

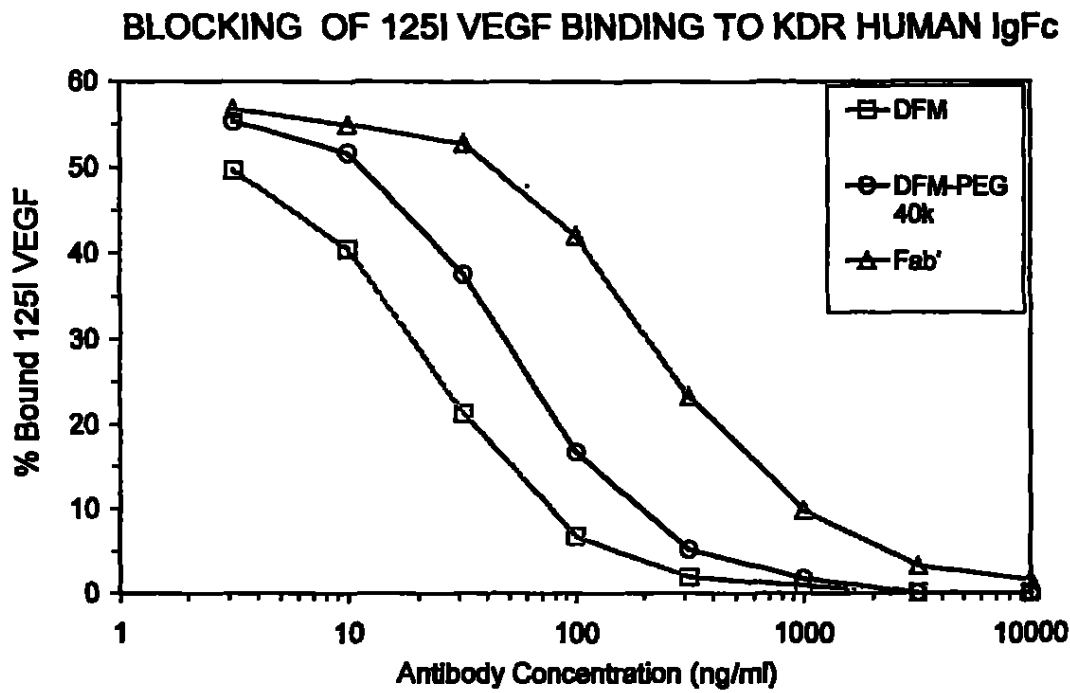


Figure 21: Protein sequence of gH3-grafted heavy chain

Heavy Chain antibody sequence (SEQ ID NO:57)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSY
TYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLNGLSKDKVTSNKGTLPSSTIEKTIKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK*

Productos Biológicos

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para determinantes antigénicos del receptor que contiene el dominio insertado de quinasa humana (RDQ). La molécula de anticuerpo se une al RDQ con mayor afinidad que con el factor de crecimiento endotelial vascular humano FCVE, y previene la interacción entre FCVE y RDQ. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a los métodos 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 livianas. Cada cadena pesada y cada cadena liviana tiene en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto de cuatro regiones estructurales (RE) que alternan con tres regiones que determinan complementariedad (RDC). Las RDCs determinan la especificidad de enlace o unión antígeno de los anticuerpos y son secuencias de péptidos relativamente cortas, que continúan en las regiones estructurales de los dominios variables. Los residuos en los dominios variables están numerados convencionalmente de acuerdo a un sistema diseñado por Kabat y otros. Este sistema está indicado en Kabat y otros, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH USA (de ahora en adelante "Kabat y otros (supra)"). Este sistema de numeración se usa en las presentes memorias a menos que se indique de otra manera.

Las designaciones del residuo Kabat no siempre corresponden directamente a la numeración lineal de los residuos de amino ácidos. La actual secuencia lineal de aminoácidos puede contener menos amino ácidos o

aminoácidos adicionales comparado con la numeración estricta de Kabat, que corresponden al acortamiento de, o inserción dentro, de un componente estructural, ya sea estructura o RDC, de la estructura de dominio variable básica. La correcta numeración de residuos Kabat puede determinarse por un anticuerpo dado mediante la alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración Kabat "estándar".

Las RDCs del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (RDCH1), residuos 50-65 (RDCH2) y residuos 95-102 (RDCH3) de acuerdo a la numeración Kabat.

Las RDCs del dominio variable de cadena liviana están localizadas en los residuos 24-34 (RDCL1), residuos 50-56 (RDCL2) y residuos 89-97 (RDCL3) de acuerdo a la numeración Kabat.

La construcción de los anticuerpos RDC injertados se describe en la Solicitud de Patente Europea EP-A-0239400, la cual revela un proceso en el cual las RDCs de un anticuerpo monoclonal de ratón (Mab) se injertan dentro de las regiones estructurales de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida al sitio usando oligonucleótidos largos.

El trabajo más reciente en humanizar Mabs mediante injerto a RDC se llevó a cabo en antígenos sintéticos que reconocen Mabs, tal como NP. Sin embargo, los ejemplos en los cuales se humanizaron una lisozima que reconoce el Mab de ratón y un antígeno que reconocen el Mab de una rata en células T humanas mediante injerto a RDC, han sido descritos por Verhoeven y otros (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann y otros (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

Riechmann y otros encontraron que la transferencia de las RDCs sólo (según lo define Kabat (Kabat y otros (supra) y Wu y otros, J. Exp. Med. 132, 211-250, 1970)) no fue suficiente para suministrar una actividad satisfactoria de enlace al antígeno en el producto injertado a RDC. Se encontró que un número de residuos estructurales tienen que estar alterados de tal forma que correspondan a los de la región estructural del donador. El criterio propuesto para seleccionar cual de los residuos estructurales necesita ser alterado se describe en la solicitud de Patente Internacional No. WO 90/07861.

Un número de estudios que discuten sobre los anticuerpos que se injertan a RDC han sido publicados, incluyendo Vaughan y otros (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

El FCVE es una glicoproteína homodimérica de dos subunidades de 23 kD con similitud estructural al FCVE. Tiene un papel de desarrollo importante en la vasculogénesis, el establecimiento de un sistema de nuevos vasos sanguíneos, y está involucrada en la angiogénesis, la formación de nuevos vasos a partir de los pre-existentes. La angiogénesis involucra la proliferación, la migración y la infiltración de tejidos de células endoteliales capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes. En la misma forma que juega un papel importante en los procesos fisiológicos normales, tal como desarrollo embrionario, crecimiento folicular (incluyendo la formación del cuerpo lúteo) y la cicatrización de heridas, la angiogénesis ocurre en un número de condiciones patológicas incluyendo inflamación, psoriasis, artritis reumatoidea y crecimiento de tumores y metástasis (Folkman, J y Klagsbrun, M. Science, 235, 442-447, 1987). Por ejemplo, existe una amplia creencia de que los

tumores son incapaces de crecer más allá de cierto tamaño, a menos que se suministre un aporte dedicado de sangre mediante angiogenesis.

El FCVE es distinto a otros factores implicados como posibles reguladores de angiogenesis *in vivo* y que es un inductor de angiogenesis específica de células endoteliales.

Existen cinco isoformas monoméricas diferentes de FCVE, como resultado de la unión alternativa del mRNA. Las isoformas incluyen dos formas de enlace de membrana (FCVE₂₀₈ y FCVE₁₈₀) y tres formas solubles (FCVE₁₆₅, FCVE₁₂₁ y FCVE₁₄₅). En todos los tejidos excepto placenta humana, el FCVE₁₆₅ es la isoforma más abundante.

Los efectos del FCVE son mediados a través de su interacción con dos receptores de quinasa tirosina de alta afinidad, receptor quinasa tirosina como *fms* (FLT-1 o FCVER-1, Shibuya M. y otros, *Oncogene*, 5, 519-524, 1990) y RCD (o FCVER-2, Terman y otros, *Oncogene*, 6, 1677-1683, 1991). Tanto RCD como FLT-1 son receptores de cobertura de membrana que cada uno contiene siete dominios parecidos a inmunoglobulinas en la región de enlace - ligando extracelular, un dominio quinasa tirosina intracelular y un dominio transmembrana. El dominio transmembrana sirve para anclar el receptor en la membrana celular de las células en las cuales se expresa.

Hay varios reportes de la sobre-expresión de ambos FCVE y sus receptores dentro de tumores, tanto en los niveles de RNA como de proteínas (Dvorak y otros, *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* 237, 97, 1999). La expresión de FCVE se reajusta en respuesta a la hipoxia, que ocurre frecuentemente dentro de los tumores, y la concentración incrementada del ligando induce la expresión de sus receptores. Los ejemplos de estudios que muestran la

expresión RDC incrementada en tumores humanos incluyen: cáncer de mama (Brown y otros, Hum. Pathol., 26, 86, 1995); cáncer de colon (Takahashi y otros, Cancer Res., 55, 3964, 1995), cáncer renal (Takahashi y otros, BBRC 257, 855, 1999) y adenocarcinoma del tracto gastro intestinal (Brown y otros, Cancer Res., 53, 4727, 1993). En un estudio más reciente usando un anticuerpo que reconoce específicamente el FCVE unido a la RDC, se observó el reajuste de la vía angiogénica de FCVE/RDC en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Koukourakis y otros, Cancer Res., 60, 3088, 2000).

Un número de piezas de evidencia experimental demuestra el enlace causal entre la actividad de FCVE y la angiogénesis del tumor *in vivo*. Kim y otros, Inyectaron un Mab neutralizante anti-FCVE dentro de los ratones desnudos que tiene tumores y demostraron un crecimiento suprimido de tumor (Nature, 362, 841, 1993). La expresión retroviral de un ratón negativo dominante RCD (FLK-1) también inhibió el crecimiento de tumor en ratones (Millauer y otros, Nature, 367, 576, 1993).

De igual manera, el antisense de FCVE (Cheng y otros, PNAS, 93, 8502, 1996), los anticuerpos anti-FLK-1 (Witte y otros, Cancer Metast. Rev., 17, 155, 1998) y la expresión de FLT-1 soluble (Goldman y otros, PNAS, 95, 8795, 1998) todos inhibieron el crecimiento de tumor en los modelos de ratones.

Algunas piezas de evidencia experimental sugieren que los efectos biológicos del FCVE en relación con la angiogenesis son mediados predominantemente a través del receptor RDQ (para revisión ver Larrivee y Karsan, Int. J. Mol. Med., 5, 447, 2000).

La activación mediada por el FCVE de RDQ sólo (en líneas de células que expresan solamente un tipo de FCVER) mostró ser suficiente para causar

la proliferación de células y la migración (Waltenburger y otros, J. Biol. Chem., 269, 26988, 1994). A la inversa, cuando el FLT-1 sólo está activado, la proliferación de células no se ve y la migración de células es observada inconsistentemente.

Los experimentos utilizando los mutantes del FCVE selectivos de receptor han demostrado que la ligación de RDQ activa la quinasa de la proteína activada con mitógeno (QPAM) dando el aumento de proliferación, migración y permeabilidad vascular (Keyt y otros, J. Biol. Chem., 271, 5638, 1996). El mutante selectivo FLT-1 fue inactivo en estos ensayos.

Un Mab anti-FCVE bloqueando la interacción con RDQ pero no con FLT-1, fue capaz de inhibir la permeabilidad vascular inducida por FCVE, mientras que un anticuerpo anti-FCVE no bloqueado no tuvo efecto (Brekken y otros, Cancer Res., 60, 5117, 2000).

La producción de Mabs contra el receptor de FCVE murino, FLK-1, por tecnología de hibridoma ha sido descrita (WO 94/11499). Esto fue demostrado para inhibir la activación del receptor FLK-1 bloqueando la interacción de FCVE con el receptor. Esta inhibición de la activación del receptor fue efectiva en la inhibición de la angiogénesis inducida por el FCVE en ciertos modelos. Además, este anticuerpo anti-FLK-1 probó ser efectivo en el tratamiento de algunos tumores xenoinjertados de ratón. Sin embargo, no todos los anticuerpos que unen la FLK-1 se unirán al RDQ con suficiente afinidad para eficacia terapéutica.

El enlace FCVE-RDQ también inhibe la apoptosis de vasos sanguíneos formados recientemente, mediante la activación mediada por RDQ de las vías de señalización PI3-quinasa-Akt quinasa (Akt quinasa es una

quinasa bien conocida de flujo descendente de la vía de la PI3-quinasa, involucrada en la supervivencia de células, Gerber y otros J. Biol. Chem., 273, 30336, 1998). Los modelos animales también demostraron la efectividad del bloqueo de esta respuesta anti-apoptótica a través del bloqueo de la interacción del FCVE-RDQ.

Se cree actualmente que el RDQ es el receptor más importante en la mediación de los efectos del FCVE y su papel en la promoción de la angiogenesis y la sobrevivencia de nuevos vasos aparece universalmente reconocida.

Por lo tanto, una molécula de anticuerpo capaz de enlazarse al RDQ y bloquear su activación por FCVE puede ser de beneficio terapéutico en el tratamiento de patologías en las cuales están implicadas el FCVE y/o RDQ. Por ejemplo, casos de inflamación, psoriasis, artritis reumatoidea y crecimiento de tumores. Existen también argumentos contundentes de que esto puede ser mejor logrado a través del bloqueo de su interacción con el receptor RDQ. Existe la necesidad de que tal molécula de anticuerpo pueda ser usada repetidamente y producida fácil y eficientemente. También existe la necesidad de una molécula de anticuerpo que tiene una alta afinidad para el RDQ y baja inmunogenicidad en humanos.

En un primer aspecto, la presente invención suministra una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ, que comprende una cadena pesada donde el dominio variable comprende una RDC (según se define por Kabat y otros, (supra)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (Sec. ID No:1) para RCDH1, como H2 en la Figura 2 (Sec. ID. No:2) para RDCH2 o como H3 en la Figura 1 (Sec. ID. No:3) para RDCH3.

La molécula de anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende al menos una RDC seleccionada a partir de H1, H2 y H3 (Sec. ID. No:1 hasta Sec. ID No; 3) para el dominio variable de cadena pesada. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos o más preferiblemente todas las tres RDCs en el dominio variable de cadena pesada.

En un segundo aspecto de la presente invención, se suministra una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humana, que comprende una cadena liviana donde el dominio variable comprende una RDC (según se define por Kabat y otros (supra)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (Sec. Id. No: 4) para RDCL1, como L2 en la figura 1 (Sec. Id. No. 5) para RDCL2 o como L3 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 6) para RDCL3.

La molécula de anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende al menos una RDC seleccionada de L1, L2 y L3 (Sec. Id. No. 4 hasta Sec. Id: No. 6) para el dominio variable de cadena liviana. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos o más, preferiblemente todas las tres RDC en el dominio variable de cadena liviana.

Las moléculas de anticuerpo del primer y segundo aspecto de la presente invención preferiblemente tienen una cadena liviana 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 donde el dominio variable comprende una RDC (según se define en Kabat y otros (supra)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 1) para RDCH1, como H2 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 2) para RDCH2 o como H3 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 3) para RDCH3, y una cadena liviana donde el dominio

variable comprende una RDC (según se define en Kabat y otros (supra)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 4) para RDCL1, como L2 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 5) para RDCL2 o como L3 en la Figura 1 (Sec. Id. No. 6) para RDCL3.

Las RDCs dadas en las Sec. Id. Nos. 1 a 6 (Figura 1) referidas más arriba son derivados de un anticuerpo VR165 monoclonal de ratón. La presente invención también suministra el anticuerpo VR165 monoclonal de ratón. Las secuencias de los dominios variables del anticuerpo VR165 se muestran en la Figura 2 (Sec. Id. Nos. 7 y 8). La región constante de cadena liviana de VR165 es kappa, y la región constante de cadena pesada es IgG2a. Este anticuerpo de ratón se refiere más abajo como el "anticuerpo donador".

En una segunda realización alternativamente preferida, el anticuerpo de acuerdo a cualquiera de los aspectos primero o segundo de la presente invención es una molécula de anticuerpo ratón/humano quimérico, referido en la presente como la molécula de anticuerpo VR165 quimérico. La molécula de anticuerpo VR165 quimérico comprende los dominios variables del Mab Vr165 del ratón (Sec. Id. Nos. 7 y 8) y los dominios constantes humanos. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo VR165 quimérico comprende el dominio C kappa humano (Hieter y otros, Cell, 22, 197-207, 1980; Genbank accession number J00241) en la cadena liviana y dominios humanos gamma 4 (Flanagan y otros, Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada.

En una tercera realización alternativamente preferida, el anticuerpo de acuerdo a cualquiera de los aspectos primero o segundo de la presente invención es una molécula de anticuerpo injertada a RDC. El término "molécula de anticuerpo injertada a RDC" según se usa en la presente, se

refiere a una molécula de anticuerpo donde la cadena pesada y/o liviana contiene una o más RDCs del anticuerpo donador (por ejemplo, un Mab de murino) injertado en una estructura de la región variable de cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, anticuerpo humano).

Preferiblemente, tal anticuerpo injertado a RDC tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales de un aceptor humano, así como uno o más de las RDCs donadoras referidas más arriba.

Cuando las RDCs se injertan, se puede usar cualquier secuencia de estructura de región variable aceptor, tomando en cuenta la clase /tipo del anticuerpo donador a partir de los cuales se derivan las RCDs, incluyendo regiones estructurales de ratón, primate, y humanas. Ejemplos de estructuras humanas que pueden ser usadas en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat y otros (supra)). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden ser usadas para la cadena pesada, REI puede ser usada para la cadena liviana y EU, LAY y POM pueden ser usadas tanto para la cadena pesada como liviana.

Las regiones estructurales preferidas para la cadena pesada son las regiones estructurales humanas germinales del grupo 3 mostradas en la Figura 3 (VH3-7, GL, Sec. Id. No. 9). Las regiones estructurales preferidas para la cadena liviana son las regiones estructurales humanas de línea germinal de secuencia de grupo 1 mostradas en la figura 3 (A30 GL, Sec. Id. No. 10).

En un anticuerpo injertado a RDC de la presente invención, se prefiere el uso, como un anticuerpo aceptor, de uno que tenga las cadenas que son homólogas a las cadenas del anticuerpo donador. Las cadenas aceptoras pesada y liviana no necesariamente necesitan ser derivadas del mismo

anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

También, en un anticuerpo injertado a RDC de la presente invención, las regiones estructurales no necesitan tener exactamente la misma secuencia de las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden cambiarse a residuos más frecuentemente presentes para esa clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones estructurales aceptoras pueden cambiarse en tal forma que ellos correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador. Tales cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. En WO 91/09967 se fija un protocolo para seleccionar residuos en las regiones estructurales aceptoras en las que sea necesario el cambio.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada a RDC de la presente invención, si la cadena pesada aceptora tiene regiones estructurales humanas de línea germinal del grupo 3 (mostradas en la Figura 3) (Sec. Id. No. 9) entonces las regiones estructurales aceptoras de la cadena pesada comprenden además de una o más RDCs donadoras, residuos donadores en las posiciones 77 y 93 (de acuerdo la Kabat y otros (supra)).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada a RDC de acuerdo a la presente invención, si la cadena liviana aceptora tiene regiones estructurales humanas del grupo 1 (mostradas en la Figura 3) (Sec. Id. No. 10) entonces las regiones estructurales aceptoras de la cadena liviana comprenden los residuos del donador en las posiciones 36, 44, 60, 66, 69, 70 y 71 (de acuerdo a Kabat y otros (supra)).

Los residuos del donador son residuos del anticuerpo donador, esto es, el anticuerpo a partir del cual las RDCs originalmente se derivaron.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una molécula de anticuerpo completa, que tiene cadenas pesadas y livianas de longitud completa; un fragmento de la misma, tal como un Fab, Fab modificado, di-Fab, un di(Fab modificado), Fab', F(ab')₂ o fragmento Fv; un monómero o dímero de cadena liviana o cadena pesada; un anticuerpo de cadena simple, por ejemplo un Fv de cadena simple en el cual los dominios variables de cadenas pesada y liviana se juntan mediante el juntor de péptido. De manera similar, las regiones variables de cadena liviana y pesada pueden ser combinadas con otros dominios de anticuerpo, según sea apropiado.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab, Preferiblemente, el fragmento Fab tiene una cadena liviana que tiene la secuencia dada como Sec. Id. No. 11 (Figura 4) y una cadena pesada que tiene la secuencia dada como Sec. Id. No. 12 (Figura 5). Las secuencias de amino ácido dadas en la Sec. Id. No. 11 y Sec. Id. No. 12 están preferiblemente codificadas por las secuencias de nucleótido dadas en la Sec. Id. No. 13 y Sec. Id. No. 14, respectivamente (Figura 4 y Figura 5).

Alternativamente, es preferible que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento Fab modificado, donde la modificación es la adición en el extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más amino ácidos para permitir la unión de una molécula efectora o reportera. Preferiblemente, los amino ácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno o dos residuos cisteína a los cuales se puede juntar la molécula efectora o reportera. Tal fragmento Fab

modificado tiene preferiblemente una cadena liviana que tiene la secuencia dada como Sec. Id. No. 11, y la cadena pesada que tiene la secuencia dada como Sec. Id. No. 12. Las secuencias de amino ácidos dadas en Sec. Id. No. 11 y Sec. Id. No. 12, son preferiblemente codificadas por las secuencias de nucleótido dadas en la Sec. Id. No. 13 y Sec. Id. No. 14, respectivamente.

En una alternativa adicional, es particularmente preferido que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento di-(Fab modificado), donde la modificación es la adición en el extremo C-terminal de cada cadena pesada Fab de uno o más aminoácidos para permitir la unión de la cadena a otra tal cadena y a una molécula efectora o reportera. Preferiblemente, los amino ácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno, dos o tres residuos cisteína, para unir a otro Fab, las moléculas efectoras o reporteras.

Un grupo efector preferido es una molécula de polímero, que puede estar unida al fragmento Fab modificado o di-(Fab modificado) para aumentar su vida media *in vivo*.

La molécula de polímero puede, en general, ser un polímero sintético o presente en la naturaleza, por ejemplo, un polímero polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo homo- o hetero- polisacárido.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos arriba mencionados incluyen uno o más grupos hidroxil, metil o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenoglicol), poli(propilenoglicol), poli(vinilalcohol) de cadena

recta o ramificada opcionalmente sustituidos, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenoglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenoglicol) o derivados del mismo.

Los polímeros que se encuentran presentes en la naturaleza incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno, o derivados de los mismos. "Derivados" según se usa en la presente pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos tiol selectivos tales como maleimidias y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento de unión al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo formará en algunos casos parte del producto como el grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio desde 500 Da hasta 50000 Da, preferiblemente desde 5000 hasta 40000 Da y más preferiblemente desde 25000 hasta 40000 Da. El tamaño del polímero puede ser seleccionado en particular a base del uso que se pretende dar al producto.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero polialquileno, tal como un poli(etilenoglicol) o, especialmente un metoxipoli(etilenoglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el rango desde aproximadamente 25000Da hasta aproximadamente 40000Da.

Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar covalentemente enlazada al átomo azufre de un residuo cisteína

65

localizado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro, o en particular, un enlace sulfuro-carbón.

Cuando se desea, el fragmento de anticuerpo puede tener uno o más otras moléculas efectoras o reporteras unidas a él. Las moléculas efectoras o reporteras pueden unirse al fragmento de anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de amino ácidos o grupo funcional amino ácido terminal disponibles, localizados en el fragmento, por ejemplo, cualquier grupo libre amino, imino, hidroxil o carboxil.

Un polímero activado puede ser usado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo polímero-modificado, según se describe más arriba. El polímero activado puede ser cualquiera que contiene un grupo reactivo tiol, tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, iodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o pueden ser preparados a partir de materiales de partida comercialmente disponibles, usando procedimientos químicos convencionales.

Sobre la unión a las porciones (PEG) poli(etilenoglicol), se hace referencia a "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 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, New York.

Donde se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o reportera, éste puede ser preparado por procedimientos de ADN recombinante o químicos estándar, en los cuales el fragmento de anticuerpo se une ya sea directamente o mediante un agente de enlace a la molécula efectora o reportera ya sea antes o después de la reacción con el polímero activado, según sea apropiado. Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/09195 y WO 89/01476. Alternativamente, donde la molécula efectora o reportera es una proteína o polipéptido se puede lograr la unión usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, según se describe en WO 86/01533 y EP-A-0392745.

Preferiblemente, el fragmento Fab modificado o di-fab de la presente invención es PEGilado (esto es, tiene PEG (poli(etilenoglicol)) o mPEG (metoxipoli(etilenoglicol)) covalentemente unido al mismo) de acuerdo a los métodos revelados en EP-A-0948544 y EP-A-1090037. Preferiblemente la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado pegilado, según se muestra en la Figura 6 o un fragmento di-(Fab modificado) pegilado. Según se muestra en la Figura 6, el fragmento Fab modificado tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un grupo tiol simple en una región de articulación modificada. Un residuo lisina está enlazado covalentemente a un grupo maleimida. A cada uno de los grupos amino en el residuo lisina se une un polímero metoxipoli(etilenoglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000Da. De manera similar cada mPEG puede estar unido a un residuo lisina unido covalentemente a un juntor

bis-maleimida, según se describe en EP-A-1090037 para formar un di(Fab-modificado) PEGilado de acuerdo a la invención.

Preferiblemente, en el compuesto mostrado en la Figura 6, la cadena pesada de la parte de anticuerpo tiene la secuencia dada como Sec. Id. No. 12, y la cadena liviana tiene la secuencia dada en Sec. Id. No. 11.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si está presente, pueden ser seleccionados en lo que respecta a la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pueden ser requeridas. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. En particular, los dominios de región constante humana IgG pueden ser usados, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando se pretenda que la molécula de anticuerpo tenga usos terapéuticos y se requiera las funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden ser usados cuando se pretenda que la molécula de anticuerpo tenga propósitos terapéuticos y no se requiera las funciones de receptor de anticuerpo, por ejemplo, para bloqueo simple de la ligazón RDQ por FCVE.

También, 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, unidos a éste mediante una estructura de puente covalente. Alternativamente, los procedimientos de tecnología ADN recombinante pueden ser usados para producir una molécula de anticuerpo en la cual el fragmento Fc (CH2, CH3 y dominios de articulación), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa ha

sido reemplazada mediante, o se ha unido a la misma mediante enlace de péptido, una proteína no inmunoglobulina funcional, tal como una molécula toxina o enzima.

La molécula de anticuerpo de la presente invención tiene preferiblemente una afinidad de enlace de 0.4×10^{-10} . Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable de cadena pesada gH3 (Sec. Id. No. 15) y el dominio variable de cadena liviana gL3 (Sec. Id. No. 16). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas livianas y pesadas se muestran en la Figura 7.

La presente invención también se refiere a variantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada para RDQ. Tales variantes pueden ser obtenidas mediante un número de protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de RDCs (Yang y otros, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), arrastre de cadena (Marks y otros, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de E. coli (Low y otros, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), arrastre de ADN (Patten y otros, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), exposición de fago (Thompson y otros, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramerl y otros, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan y otros, (supra) discute estos métodos de maduración de afinidad.

La presente invención también suministra una secuencia de ADN que codifica la o las cadenas pesadas y/o livianas de la molécula de anticuerpo de la presente invención, por ejemplo según se describe en las figuras incluidas en la presente.

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

La presente invención también se refiere a un vector de expresión o clonación 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 liviana y cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.

En una realización preferida, la presente invención suministra un vector de expresión de E. Coli, que comprende una secuencia de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de expresión es pTTOD(CDP791) según se muestra esquemáticamente en la Figura 8.

Los métodos generales mediante los cuales los vectores pueden ser contruidos, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

Las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención pueden ser obtenidas por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican para parte o todas las cadenas livianas y pesadas de anticuerpo pueden ser sintetizadas, según se desea, a partir de secuencias de ADN determinadas o en base a las correspondientes secuencias de amino ácido.

La codificación de ADN para secuencias estructurales aceptoras está ampliamente disponible para los expertos en la técnica, y puede ser fácilmente sintetizada a base de sus secuencias conocidas de amino ácidos.

Se pueden usar las técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN, codificando para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias deseadas de ADN pueden ser sintetizadas completamente o en parte usando las técnicas de síntesis de oligonucleótido. La mutagénesis dirigida en sitio y las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) pueden ser usadas según sea apropiado.

Cualquier sistema apropiado, huésped, célula/vector puede ser usado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula del anticuerpo de la presente invención. Las bacterias, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos pueden ser usados, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab, di-(Fab modificado) y $F(ab')_2$, y especialmente fragmentos Fv, y fragmentos de anticuerpo de cadena simple, por ejemplo, Fvs. Eukaryotic, de cadena simple, por ejemplo, mamíferos, sistemas de expresión de células huésped se pueden usar para producción de moléculas más grandes de anticuerpo, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO, mieloma o hibridoma.

La presente invención también suministra un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo a la presente invención, que comprende el cultivo de una células huésped, que comprenden un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para llevarle hacia la

expresión de la proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislando la molécula de anticuerpo.

Preferiblemente, el proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende, cultivar E. Coli que comprende un vector de expresión de E. Coli, que comprende la secuencia de ADN de la presente invención bajo condiciones adecuadas para llevar hacia la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ADN y aislando la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo puede ser secretada a partir de la célula o dirigirse hacia el periplasma por secuencias de señal adecuadas. Alternativamente, las moléculas de anticuerpo pueden acumularse dentro del citoplasma de las células. Preferiblemente la molécula de anticuerpo está dirigida hacia el periplasma. Dependiendo de la molécula del anticuerpo que ha sido producida y del proceso usado, es deseable permitir que las moléculas de anticuerpo se redoblen y adopten una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que las moléculas de anticuerpo se redoblen son bien conocidas por los expertos en la técnica.

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena liviana o pesada, en cuyo caso solamente un polipéptido de cadena pesada o cadena liviana que codifique la secuencia necesita ser usado para transfectar las células huésped. Para producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como livianas, la línea de células puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena liviana y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un vector simple, el vector que

incluye secuencias que codifican los polipéptidos de cadena liviana y cadena pesada.

La presente invención también suministra una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención suministra también un proceso para la preparación de una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende la mezcla de la molécula anticuerpo de la presente invención junto con un excipiente o portador 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 incluyendo otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo células anti-T, anti-IFN gamma o anticuerpos anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tal como xantinas.

Las composiciones farmacéuticas deben comprender preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" según se usa en la presente se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición que es el objetivo, o para mostrar un efecto preventivo o terapéutico detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo de células o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal puede también ser usado para determinar el rango de concentración apropiado y la ruta de administración.

Tal información luego puede ser usada para determinar dosis útiles y rutas para administración en humanos.

La cantidad efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y frecuencia de administración, la combinación(es) de droga, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación de rutina y está a criterio del clínico. Generalmente, una dosis efectiva será desde 0.01 mg/kg hasta 50 mg/kg, preferiblemente 0.1 mg/kg a 20 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o pueden ser administradas en combinación con otros agentes, drogas u hormonas.

La dosis a la cual la molécula de anticuerpo de la presente invención es administrada depende de la naturaleza de la condición a ser tratada, el grado en el cual el nivel de FCVE a ser neutralizado es, o espera ser, aumentado sobre el nivel deseado, y si la molécula de anticuerpo está siendo usada profilácticamente o para tratar una condición existente. La dosis será también seleccionada de acuerdo a la edad y la condición del paciente.

Así, por ejemplo, donde el producto es para tratamiento o profilaxis de una enfermedad inflamatoria crónica, tal como artritis reumatoidea, las dosis adecuadas de la molécula de anticuerpo de la presente invención caen en el rango de entre 0.5 y 50 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 20 mg/kg y más preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg. La frecuencia de la dosis

24

dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y la duración de su efecto.

Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (por ejemplo, 2 a 15 días) podría ser solamente necesario dar una dosis una vez al día, por semana o aún una vez cada 1 o 2 meses.

Una composición farmacéutica puede también contener un portador farmacéuticamente aceptable para administración del anticuerpo. El portador no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas metabolizadas lentamente, grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, amino ácidos poliméricos, copolímeros de amino ácido y partículas de virus inactivo.

Se pueden usar las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes o sustancias amortiguadoras de pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como tabletas, píldoras,

75

grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones para ingesta del paciente.

Las formas preferidas de administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo por inyección de bolo o infusión continua. Donde el producto es para inyección o infusión, este 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, preservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, es preferible que las composiciones se adapten para administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por cualquier número de rutas incluyendo, pero no limitado a, rutas oral, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, transcutáneo (por ejemplo, ver WO 98/20734), subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, entérico, tópico, sublingual, intravaginal o rectal. Pueden ser también usados los hipoatomizadores para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden ser preparadas como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar las formas

sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La entrega directa de las composiciones se lograría generalmente por inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, o intramuscularmente o entregado al espacio intersticial de un tejido. Se pueden también administrar las composiciones dentro de una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosificación única o un esquema de dosificación múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible para degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si la composición es para ser administrada mediante una ruta usando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protegen el anticuerpo de la degradación pero que liberan el anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde tracto gastrointestinal.

Una discusión completa de portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceuticals Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

También se consideró que el anticuerpo de la presente invención será administrado mediante uso de la terapia de genes. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas livianas y pesadas de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes de ADN apropiados son introducidas dentro del paciente, de tal manera que las cadenas de anticuerpos se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan in situ.

La presente invención también suministra la molécula de anticuerpo de la presente invención para uso en el tratamiento de una enfermedad en la cual está implicado el FCVE y/o RDQ.

La presente invención suministra además el uso de la molécula de anticuerpo de acuerdo a la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento en el cual está implicado el FCVE y/o RDQ.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede ser usada en cualquier terapia donde es deseable reducir el nivel de RDQ biológicamente activo, presente en el cuerpo humano o animal. El FCVE puede circular en el cuerpo o estar presente en un nivel alto indeseable localizado en un sitio particular del cuerpo.

Por ejemplo, el FCVE (y por lo tanto RDQ) ha sido implicado en un número de condiciones patológicas incluyendo inflamación, psoriasis, artritis reumatoidea y crecimiento de tumores y metástasis.

La presente invención también suministra un método para tratar sujetos humanos o animales que sufren de o están en riesgo de un trastorno en el cual el FCVE y/o RDQ está implicado, comprendiendo el método la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede también ser usada en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico in vivo y representando los estados de enfermedad que involucran niveles elevados de RDQ.

La presente invención se describe además a manera de ilustración solamente en los siguientes ejemplos que se refieren a las Figuras que se acompañan, en los cuales:

La Figura 1 muestra las secuencias de RDC de las V regiones de cadena pesada y liviana del gen de anticuerpo monoclonal de ratón (SEC. ID. NOS: 1-6)

La Figura 2 muestra la secuencia de proteína del anticuerpo monoclonal de ratón VR165, dominios VH y VL (SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8).

La Figura 3 muestra las secuencias de proteína de la V-región escogida como estructuras aceptoras de línea germinal humana. La GL VH3-7 es una línea germinal humana del gen VH (SEC. ID. No. 9). La GL A30 se refiere a la secuencia de línea germinal VL humana del gen A30 (SEC. ID. No. 10). En cada caso la secuencia de línea germinal de la estructura 4 se suministra mediante la línea germinal humana JH4 y JK1 respectivamente.

La Figura 4, muestra la secuencia de amino ácido y nucleótido de la cadena liviana Fab CDP791 (SEC. ID. No. 11 y SEC. ID. No. 13).

La Figura 5, muestra la secuencia de amino ácido y nucleótido de la cadena pesada Fab CDP791 (SEC. ID. No. 12 y SEC. ID. No. 14).

La Figura 6 muestra la estructura de un fragmento Fab modificado derivado del anticuerpo enlazado covalentemente VR165 mediante un residuo cisteína a un enlace lisil-maleimida, donde cada grupo amino en el residuo lisil está covalentemente enlazado al mismo un residuo PEG metoxi donde n es aproximadamente 420;

La Figura 7 muestra las secuencias de proteínas para los genes de dominio VH y VL de la RDC injertada optimizada (SEC. ID. No. 15 y SEC. ID. No. 16).

La Figura 8 muestra el plásmido pTTOD optimizado (CDP791) que contiene la variante IGS-2 entre los injertos gL3 y gH3.

La Figura 9 muestra la secuencia de proteína de los injertos VH y VL designados (gH1-3 y gL1-3, SEC. ID. Nos 17-22). El injerto gH1 contiene residuos estructurales no murinos. El injerto gH2 contiene residuos murinos en las posiciones 77 y 93 (numeración de Kabat). Tanto T como S son comunes en las secuencias de línea germinal humana en la posición 77, así la inclusión de T es aún consistente con un residuo humano. El V en la posición 93 es probablemente importante en la interfase VH/VL. La inclusión de los residuos humanos en 60 y 62 representa los cambios para la porción C-terminal de RDC-H2. El injerto gL2 contiene residuos murinos en las posiciones 60, 66, 69, 70 y 71 (numeración Kabat). El injerto gL3 contiene residuos murinos adicionales en las posiciones 36 y 44.

La Figura 10 muestra el diseño genes que codifican los injertos gH1 y gL1 (SEC. ID. No. 23 y SEC. ID. No. 24).

La Figura 11 muestra los oligonucleótidos usados para ensamblar los genes que codifican para los injertos gL1 y gH1 (SEC. ID. Nos: 25-40).

La Figura 12 muestra los plásmidos de pCR2.1 (gH1) y pCR2.1 (gL1) que contiene los injertos gH1 y gL1, respectivamente.

La Figura 13 muestra cartuchos de oligonucleótidos usados en la construcción de injertos gH2, gH3, gL2 y gL3 (SEC. ID. Nos. 41-44).

La Figura 14 muestra los pares de oligonucleótidos usados en la construcción de injertos gH2, gH3, gL2 y gL3 (SEC. ID. Nos. 45-52).

La Figura 15 muestra plásmidos pGamma 4 y pMR 10.1 dentro de los cuales los injertos VH y VL, respectivamente, se sub clonaron para permitir la expresión de líneas de células CHO.

La Figura 16 muestra el plásmido de expresión pTTOD Fab' de E. coli en este caso conteniendo la secuencia IGS-3.

La Figura 17 muestra la secuencia de nucleótido de las tres regiones IGS probadas (SEC. ID. Nos: 53-55).

La Figura 18 muestra los resultados de la comparación de fermentación de Fab de la ejecución de IGS.

La Figura 19 muestra la codificación y la secuencia de flanqueo del fragmento Fab' CDP791 (SEC. ID. No. 56).

La Figura 20 muestra los resultados de radioinmunoensayo en los cuales los fragmentos de anticuerpo se prueban para bloqueo del enlace del FCVE a RDQ.

La Figura 21 muestra la secuencia de amino ácido de la cadena pesada entera del anticuerpo monoclonal derivado de VR165 Injertado a gH3.

EJEMPLOS

Producción y selección de Anticuerpo Monoclonal

Un programa de inmunización local se inició para seleccionar un anticuerpo para RDQ humana que bloquee potentemente la interacción con su ligando FCVE. Se inmunizaron los ratones con una variedad de inmunógenos incluyendo células CHO transfectadas con un RDQ humano de longitud completa, proteínas de fusión humanas purificadas Fc de RDQ humano y ADN que codifico estas proteínas de fusión. De un total de 19 fusiones de animales inmunizados con Inmunógenos de células/proteínas y 4 fusiones a partir de animales inmunizados con ADN, aproximadamente 23,000 pocillos se probaron en un formato primario de ELISA, para unirse al dominio 7

humano de RDQ-Fc. Luego se sometieron aproximadamente 800 anticuerpos a una investigación secundaria, un radiolnmuensayo que medía el bloqueo del FCVE 125-I, uniéndose al dominio 7 humano RDQ-Fc. Una tercera investigación midió el bloqueo de la liberación del factor estimulado por FCVE a partir de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs). A partir de esta cascada de investigaciones, se seleccionó el anticuerpo VR165 (no se muestran datos).

Clonación del Gen de VR165

Se preparó el ARN a partir de las células de hibridoma que expresan el VR165 y fue transcrito en reversa a ADN. Luego esto fue usado como un modelo para una serie de reacciones de PCR para amplificar las secuencias de las V-regiones. Los grupos iniciadores degenerados diseñados para fortalecer dentro de las secuencias de señal de la cadena pesada y liviana conservadas, se usaron como iniciadores de adelanto, mientras que los iniciadores que codificaban la unión de estructura 4/región C sirvieron como iniciadores de reversa. De esta manera, los genes de la V-región tanto de la cadena pesada como liviana se amplificaron y luego se clonaron y secuenciaron. Las secuencias de ADN se tradujeron para dar la secuencia de aminoácido de la V-región de VR165 que fue verificada por referencia a la secuencia de proteína determinada por la secuenciación N-terminal. Los genes de la V-región murinos fueron luego subclonados dentro de los vectores de expresión pMR10.1 y pGamma-4. Estos son vectores separados para expresión de la cadena liviana y pesada respectivamente, conteniendo el ADN genómico que codifica los genes de la región constante para la cadena

liviana kappa humana y la cadena pesada gamma-4. La co transfección dentro de las células CHO genera el anticuerpo VR165 quimérico.

Diseño de secuencias Injertadas RDC

El VR165 fue Injertado a RDC en estructuras humanas para reducir la inmunogenicidad potencial y para facilitar la expresión de E. coli. Las estructuras aceptoras de la línea germinal humana se escogieron a partir del subgrupo VHIII y VLI. La estructura aceptora de cadena pesada es la secuencia de línea germinal humana VH3-7, con la estructura 4 que viene desde esta porción de la línea germinal JH4 de la región JH humana. La estructura aceptora de la cadena liviana es la secuencia de la línea germinal humana A30, con la estructura 4 que viene desde esta porción de la línea germinal JK1 de la región JK humana. El alineamiento muestra que existen 15 diferencias de estructuras entre las cadenas pesadas aceptoras y donadoras. En cada una de estas posiciones se hizo un análisis del potencial de ese residuo para contribuir a la unión de antígeno; si se considera importante el residuo donador murino se retuvo. El alineamiento de cadena liviana muestra que existen 24 diferencias de estructura entre las secuencias de donador y aceptor. Se analizó nuevamente el potencial del residuo murino para contribuir a la unión del antígeno. De esta manera, se diseñaron tres injertos VH y tres injertos VL (Figura 9, SEC. ID Nos. 17-22). En cada caso el Injerto 1 representa un Injerto sin los residuos de estructura murina. Los injertos 2 y 3 contienen residuos de estructura murina en las posiciones mostradas. El injerto gH3 también contiene residuos humanos adicionales en el extremo C-terminal de RDC-H2. Esta porción de la RDC no es una superficie de unión al antígeno. Se diseñaron los genes para codificar las secuencias injertadas,

usando codones frecuentemente usados en los genes de *E. coli* y evitando los codones de *E. coli* "raros" (Wada y otros, Nucl. Acids Res., 19, 1981-86, 1991). Se introdujeron los sitios de restricción dentro de la secuencia de ADN a intervalos, para facilitar la manipulación genética adicional. La Figura 10 muestra el diseño de genes para gH1 y gL1 (SEC. ID. No. 23 y SEC. ID. No. 24). Los oligonucleótidos usados para construir los genes se muestran en la Figura 11 (SEC. ID. Nos: 25-40).

Construcción de genes para secuencias Injertadas

Se empleó una técnica de ensamblaje de PCR para construir genes de V-región gH1 y gL1 injertados a RDC. Se colocaron volúmenes de reacción de 100 μ l que contienen Tris-HCl 10 mM pH 8.3, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, trifosfato deoxiribonucleósido de 0.25 mM cada uno, iniciadores "internos" de 1 pmol cada uno (F2, F3, F4, R2, R3, R4), iniciadores "externos" de 10 pmol cada uno (F1, R1) y una unidad de polimerasa Taq (AmpliTaq, Applied Biosystems, catálogo no. N808-0171). Los parámetros del ciclo de PCR fueron 94°C para un minuto, 55°C para un minuto, y 72°C para un minuto, para 30 ciclos. Los productos de reacción se corrieron luego en un gel de agarosa 1.5%, se cortaron y recuperaron usando columnas rotatorias QIAGEN (kit de gel de extracción QIAquick, cat. No. 28706). Se eluyó el ADN en un volumen de 30 μ l. Luego se clonaron alícuotas (1 μ l) del ADN de gH1 y gL1 en de un vector de clonación InVitrogen TOPO TA pCR2.1 TOPO (catálogo No. K4500-01) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este vector de no expresión sirvió como un intermediario de clonación para facilitar la secuenciación de un gran número de clones. La secuenciación de ADN usando iniciadores específicos de vector, se usó para identificar los clones

correctos que contienen gH1 y gL1, creando plásmidos pCR2.1 (gH1) y pCR2.1 (gL1) (ver Figura 12).

Un método de reemplazo de cartucho de oligonucleótido se usó para crear los injertos humanizados gH2 y gL2. La Figura 13 muestra el diseño de los cartuchos de oligonucleótidos (SEC. ID. No. 41 y SEC. ID. No. 43). Para construir cada variante, se corto el vector (pCR2.1 (gH1) o pCR2.1(gL1)) con las enzimas de restricción mostradas (Figura 13, sitios de restricción subrayados), el fragmento de vector largo fue purificado en gel a partir de agarosa y se usó en unión con el cartucho de oligonucleótido. La Figura 14 muestra las secuencias de los oligonucleótidos usados en los cartuchos (SEC. ID. Nos: 45-46 y SEC. ID. Nos. 49-50). Se reforzaron los pares entre ellos, mezclando a una concentración de 0.5 pmoles/ul en un volumen de 200 ul que contiene 12.5 mM de Tris HCl pH 7.5, MgCl₂ 2.5 mM, NaCl 25 mM, ditioneitról 0.25 mM y calentando a 95°C por 3 minutos en un baño de agua (volumen 500 ml), luego dejando enfriar lentamente a temperatura ambiente. El cartucho de oligonucleótido reforzado fue luego diluido diez veces en agua antes de la unión en del vector de corte apropiado. La secuenciación de ADN se usó para confirmar la secuencia correcta, creando plásmidos pCR2.1 (gH2) y pCR2.1 (gL2).

Las variantes gH3 y gL3 se construyeron en una forma similar a partir de gH2 y gL2. Los cartuchos y oligonucleótidos se mostraron en las Figuras 13 y 14 (SEC. ID. No. 42 y SEC. ID. No. 44, SEC. ID. Nos. 47-48 y SEC ID Nos: 51-52). La construcción de gL3 requirió de una estrategia modificada debido a la existencia de sitios PvuI en el esqueleto del vector pCR2.1. La separación de pCR2.1(gL2) con AatII y SfuI creó una molécula de vector dentro de la cual

se ligó el cartucho PvuI-AatII reforzado más un fragmento SfuI-PvuI del par base 225, también preparado a partir de pCR2.1 (gL2). La secuenciación de ADN se usó para confirmar la secuencia correcta, creando plásmidos pCR2.1 (gH3) y pCR2.1 (gL3).

Cada uno de los tres injertos de cadena pesada fue luego subclonado en el vector de expresión pGamma-4 como fragmentos HindIII-ApaI. Cada uno de los tres injertos de cadena liviana fue subclonado en el vector de expresión de cadena liviana pMR10.1 como fragmentos SfuI-Bsi WI. La Figura 15 muestra mapas de estos vectores de expresión. Los anticuerpos fueron expresados temporalmente mediante co transfección en células CHO. Todas las combinaciones de la cadena injertada y cadena quimérica se expresaron y se compararon contra el anticuerpo quimérico doble.

La unión se evaluó en un ELISA de unión a RDQ, en un radioinmunoensayo de la inhibición del FCVE marcado unido a RDQ y en un ensayo BIAcore de unión a RDQ. Todas las formas injertadas se ejecutaron bien en el ELISA y el radioinmunoensayo, mostrando actividad similar a la quimérica. A partir del análisis BIAcore, se seleccionó el gL3gH3 del injerto como el óptimo (no se muestran los datos) y de aquí en adelante se denomina como g165.

Construcción del plásmido pTTOD

El plásmido pTTO-1 se construyó como sigue:

(a) Reemplazo del polí enlazador del pTTQ9

El plásmido pTTQ9 se obtuvo a partir de Amersham. Se digirió una alícuota (2 ug) con enzimas de restricción SalI y EcoRI, el digerido se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento largo de ADN (4520 bp). Se

sintetizaron dos oligonucleótidos que, cuando se reforzaron entre ellos, codificaron la región polienlazadora OmpA. Esta secuencia tiene extremos cohesivos que son compatibles con los extremos Sall y EcoRI generados por restricción de pTTQ9. Clonando este "cartucho" de oligonucleótido en el vector pTTQ9, el sitio Sall no se regenera, pero el sitio EcoRI se mantiene. El cartucho codifica los 13 primeros aminoácidos de la secuencia de señal de la proteína de membrana externa de E. coli Omp-A, precedida por el sitio de unión del ribosoma Shine Dalgarno del gen OmpA. Además están presentes los sitios de restricción para enzimas XbaI, MuiI, StyI, y SphI. Los sitios MuiI y StyI están dentro de la región de codificación de la secuencia de señal OmpA y se proponen como los sitios de clonación 5' para inserción de genes. Los dos oligonucleótidos que hacen este cartucho se reforzaron entre ellos por la mezcla a una concentración de 5 pmoles/ul y calentando en un baño de agua a 95°C por 3 minutos, luego enfriando lentamente a temperatura ambiente. La secuencia reforzada fue luego ligada en Sall/EcoRI corte pTTQ9. El intermediario plásmido resultante, nombrado como pTQOmp, se verificó por secuenciación de ADN.

(b) Preparación y ligamento del Fragmento

Se construyó el plásmido pTTO-1 ligando un fragmento de ADN del plásmido pACYC184 a dos fragmentos generados a partir de pTQOmp. El plásmido pACYC184 se obtuvo de New England Biolabs. Se digirió una alícuota (2 ug) hasta completar la enzima de restricción StyI, luego se trató con Mung Bean Nuclease, este tratamiento creó extremos romos mediante la poda de las salientes de base 5'. Después de la extracción de fenol y la precipitación de etanol, se restringió el ADN con la enzima PvuII, generando

fragmentos de 2348, 1081, 412 y 403 bp. El fragmento 2348 bp se purificó después de la electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento codificó el marcador de resistencia a la tetraciclina y el origen de replicación p15A. Luego se trató el fragmento con fosfatasa alcalina de intestino de cabra para retirar los fosfatos de terminal 5', previniendo con ello la auto unión de esta molécula.

Se digirió una alícuota (2 ug) del plásmido pTQOmp con enzimas SspI y EcoRI, y el fragmento 2350 bp se purificó a partir de fragmentos no deseados de 2040 bp y 170 bp, seguido por la electroforesis en gel de agarosa, este fragmento codificó la región terminal transcripcional y el gen lacIq. Se digirió otra alícuota (2 ug) de pTQOmp con EcoRI y Xmml, generando fragmentos de 2289, 1670, 350 y 250 bp. El fragmento 350 bp que codifica el promotor tac, la secuencia de señal OmpA y el sitio multiclonación se purificaron en gel.

Los tres fragmentos fueron luego ligados, usando aproximadamente cantidades equimolares de cada fragmento, para generar el plásmido pTTO-1. Todas las uniones de clonación se verificaron por secuenciación de ADN.

(c) Producción del plásmido pTTOD

El plásmido pTTOD se derivó del pTTO-1 mediante retiro de los sitios de restricción del esqueleto para PvuII (3 sitios), EcoRV (2 sitios) y ApaI (1 sitio). Estos cambios se hicieron para simplificar las estrategias de codificación Fab'. Al hacer estos cambios la secuencia de proteína de codificación del gen lacIq y el gen a la resistencia a la tetraciclina no fue alterado, sin embargo los cambios "silenciosos" se hicieron a nivel de ADN. Se usó una estrategia de PCR, en la cual los iniciadores llevando cambios "silenciosos" que removieron estos sitios de restricción fueron designados y usados para amplificar las secciones del plásmido matriz (pTTO-1). Los sitios de restricción

de flaqueo (no alterados) fueron luego usados para reemplazar las secuencias en el plásmido matriz con estas secuencias modificadas. Mediante este proceso de multi-etapa se creó el plásmido pTTOD. La transferencia de los genes Fab' existentes en la molécula PEGilada de vector, se muestra en la Figura 6. Alternativamente, la reacción del Fab activado con bis-maleimida (mPEG)-IIsI según se describe en EP-A-1090037 rinde un di-(Fab modificado) PEGilado, de aquí en adelante denominado como DFM.

Actividades BIAcore de fragmentos PEGilados y puros

El dominio 7Ig humano del RDQ humano fusionado a la Fc humana se capturó en un chip recubierto con anti-Fc, y los varios fragmentos del anticuerpo Injertado a CDR g165 y el anticuerpo matriz murino VR165 fueron omitidos para permitir la determinación de la afinidad. La tabla de más abajo resume los resultados obtenidos. En este formato de ensayo existe una ventaja de divalencia, según se muestra por los rangos más bajos (K_d) de las especies divalentes. La afinidad del DFM injertado es muy similar a la IgG murina, con el DFM-PEG mostrando una reducción menor de afinidad. La K_D de la molécula DFM-PEG g165 es aproximadamente 4×10^{-11} M en este ensayo.

Tabla 1: Actividades BIAcore de los fragmentos PEGilados y puros

α -RDQ	$K_d \times 10^5$	$K_d \times 10^4$	$K_D \times 10^{10}$
DFM	21.6	0.64	0.29
DFM-PEG40	15.5	0.64	0.41
mIgG	19.8	0.60	0.30
FAB	13.6	12.4	9.1
FAB-PEG40	11.0	11.8	10.7

Radioinmunoensayo

La capacidad de los fragmentos para bloquear el FCVE que se une a RDQ se midió en un radioinmunoensayo. El anti Fc policlonal se usó para capturar el dominio 7 Ig fusionado a la RDQ para Fc humano en un plato de microtitulación, se añadió el anticuerpo o fragmento, seguido por FVCE-165 marcado con 125-I. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 20. Nuevamente en este ensayo se nota que existe una ventaja de divalencia, demostrada por su ejecución de bloqueo superior del DFM sobre el Fab'. La construcción de DFM-PEG muestra una reducción menor de la actividad comparada con el DFM puro, como se vió en el estudio BIAcore.

Ensayos basados en células

La molécula g164 DFM PEG también demostró la actividad en ensayos basados en células. Su capacidad para bloquear la estimulación del FCVE de RDQ se demostró mediante la inhibición de la liberación del factor de tejido mediante células endoteliales de vena umbilical humana (ver Clauss y otros, J. Biol. Chem., 271, 17629-17634, 1996). También se demostró la actividad mediante la inhibición del FCVE mediado por la movilización de Ca^{2+} en células endoteliales microvasculares humanas (ver Cunningham y otros, Am. J. Physiol., 276, C176-181, 1999).

Se entenderá que los ejemplos arriba descritos son meramente ejemplificadores, y no limitan el alcance de la presente invención según se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES:

1.- Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humano, que comprende una cadena pesada, donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (SEC. ID. No. 1) para RDCH1, como H2 en la Figura 1 (SEC. ID No.2) o como H3 en Figura 1 (SEC. ID. No 3) para RDCH3.

2.- Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humano, que comprende una cadena liviana, donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (SEC. ID. No. 4) para RDCL1, como L2 en la Figura 1 (SEC. ID No.5) para RDCL2, o como L3 en Figura 1 (SEC. ID. No 6) para RDCL3.

3.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una cadena pesada donde el dominio variable comprende un RDQ que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. NO. 1 para RDCH1, SEC. ID. No. 2 para RDCH2 o SEC. ID. No. 3 para RDCH3, y una cadena liviana donde el dominio variable comprende una RDC que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. No. 4 para RDCL1, SEC: ID. No. 5 para RDCL2, o SEC: ID. No. 6 para RDCL3.

4.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende la SEC. ID. NO. 1 para RDCH1, SEC. ID. No. 2 para RDCH2 o SEC. ID. No. 3 para RDCH3, SEC. ID. No. 4 para RDCL1, SEC: ID. No. 5 para RDCL2, o SEC: ID. No. 6 para RDCL3.

5.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una molécula de anticuerpo injertada a RDC.

6.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, donde el dominio variable comprende las regiones estructurales aceptoras humanas y RDC donantes no humanas.

7.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6, donde las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena pesada se basan en una secuencia de estructura de grupo 3 de línea germinal humana y comprende residuos de donador no humano en las posiciones 77 y 93.

8.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6 o reivindicación 7, donde las regiones estructurales aceptoras humanas del dominio variable de la cadena liviana se basan en una secuencia de estructural de grupo 1 de línea germinal humana y comprende residuos de donador no humano en las posiciones 36, 44, 60, 66, 69, 70 y 71.

9.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la región variable de cadena pesada gH3 (SEC: ID. NO. 15) y la región variable de cadena liviana gL3 (SEC: ID. No. 16).

10.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es un fragmento Fab.

11.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 10, que es un fragmento Fab que comprende una cadena liviana que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. No. 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. No. 12.

12.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es un fragmento Fab modificado que tiene un extremo C-terminal de

sus uno o más aminoácidos de cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora o reportera.

13.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 12, donde los aminoácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno o dos residuos cisteína, a la cual puede estar unida la molécula efectora o reportera.

14.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 12, que es un fragmento Fab modificado o di Fab que comprende una cadena liviana que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. No. 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en la SEC. ID. No. 12.

15.- Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humana, que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia dada en la SEC. ID. No. 11.

16.- Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humana, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEC. ID. No. 57.

17.- Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para RDQ humana, que tiene la cadena liviana que comprende la secuencia dada en la SEC. ID. No. 12 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEC. ID. No. 57.

18.- Una variante de la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que tiene una afinidad mejorada para RDQ.

19.- La variante de la reivindicación 18, que es obtenida mediante un protocolo de maduración de afinidad.

20.- El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo VR165 monoclonal anti RDQ murino.

21.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una molécula de anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables de cadena liviana y pesada del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 26.

22.- Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que tiene covalentemente enlazadas a un amino ácido en, o hacia el extremo C-terminal de su cadena pesada, una molécula efectora o reportera.

23.- El compuesto de la reivindicación 22, que comprende una molécula efectora.

24.- El compuesto de la reivindicación 23, donde la molécula efectora comprende uno o más polímeros.

25.- El compuesto de la reivindicación 24, donde el uno o más polímeros es/son un polímero polialquilenos, polialquilenos, o polioxialquilenos de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituida o un polisacárido ramificado o no ramificado.

26.- El compuesto de la reivindicación 25, donde el uno o más polímeros es/son un metoxipoli(etilenoglicol).

27.- Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de la reivindicación 12, que tiene unido a uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada, un grupo lisil-maleimida o lisil bis maleimida, donde cada grupo amino del residuo lisil tiene covalentemente

enlazado a él un residuo metoxipoli(etilenoglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

28.- Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y/o liviana de la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

29.- Un vector de clonación o expresión que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 27.

30.- Un vector de expresión de E. coli, que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 27.

31.- El vector de expresión de E. coli de la reivindicación 30, que es pTTOD(CDP791).

32.- Una célula huésped transformada con un vector de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

33.- Un proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 32 y el aislamiento de la molécula de anticuerpo.

34.- Un proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende el cultivo de E. coli, que comprende un vector de expresión E. coli, que comprende la secuencia de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31 y el aislamiento de la molécula de anticuerpo.

35.- El proceso de la reivindicación 34 donde la molécula de anticuerpo está dirigida al periplasma.

36.- Una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27.

95

37.- La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que tiene especificidad para RDQ humana, o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, para uso en el tratamiento de una patología en la cual están implicados el FCVE y/o RDQ.

38.- La molécula de anticuerpo o el compuesto de la reivindicación 37, para uso en el tratamiento de inflamación, psoriasis, artritis reumatoidea y crecimiento de tumores o metástasis.

39.- El uso de la molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que tiene especificidad para RDQ humano, o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología en la cual están implicados el FCVE y/o RDQ.

40.- El uso de la reivindicación 39, donde la patología es inflamación, psoriasis, artritis reumatoidea y crecimiento de tumores o metástasis.

41.- El vector pTTOD(CDP791)según se muestra en la Figura 8.

RESUMEN

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para determinantes antigénicos del receptor que contiene el dominio insertado de quinasa humana (RDQ). La molécula de anticuerpo se une al RDQ con mayor afinidad que con el factor de crecimiento endotelial vascular humano FCVE, y previene la interacción entre FCVE y RDQ. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a los métodos para producir la molécula de anticuerpo.

COLO 13115 841 0020
id - 11 / WPC13115

Figura 1: Secuencia de RDC de VR165

Cadena Pesada

H1 SYGMS	(SEC. ID. NO. 1)
H2 TITSGGSYTYYPDTVKG	(SEC. ID. NO. 2)
H3 IGEDALDY	(SEC. ID. NO. 3)

Cadena Liviana

L1 RASQDIAGSLN	(SEC. ID. NO. 4)
L2 ATSSLDS	(SEC. ID. NO. 5)
L3 LQYGSFPPT	(SEC. ID. NO. 6)

28

Figura 2: Secuencia de Dominios variables de proteína de anticuerpo VR165 monoclonal de ratón.

Cadena Pesada (SEC. ID. NO. 7)

VR165 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTF8SYGMSWVRQTPDKRLQWVATTSSGGSYTYYPDTVKG

VR165 RFTISRDN AENTLYQMSSLKSEDTAMYYCVRIGEDALDYWGQGTSTVTVSS

Cadena Liviana (SEC. ID. NO. 8)

VR165 DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIAGSLNWL RQEPDGTIKRLIYATSSLD S

VR165 GVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFVDYYCLQYGSFPPTFGGGSKLEIKR

Figura 3: Comparación de la V-región de VR165 con V-regiones de estructura escogida

SEC. ID. NO. 8: V-Región VH3-7 GL

VH3-7 GL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSYKG
VR165	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYG	MSWVRQTPDK RLQWVATITSGGSYTYYPDTVKG

VH3-7 GL	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGT	LVTVSS
VR165	RFTISRDN AENTLYLQMSSLKSEDTAMYYCV	RIGEDALDYWGQGT	SVTVSS

SEC. ID. NO. 10: V-Región A30 GL

A30 GL	DIQ MTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGI	RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQDS
VR165	DIQMTQSPSSLSAS LGERVSLTCRASQDI	AGSLNWL RQEPDGT IKRLIYATSSLDs

A30 GL	GVPSTRFSGSGSGTEFTLTIS	SLQPEDFATYYCLQHNSYP FGQGT	KVEIKR
VR165	GVPKRFSGSRSGSDYSLTIS	SESEDFVDYYCLQYGSFPPTFGGGS	KLEIKR

Figura 4: Cadena Liviana, Incluyendo secuencias de señal

(SEC. ID. NO. 13) ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT

(SEC. ID. NO. 11) M K K T A I A I A>

(SEC. ID. NO. 13) GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CCG GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA

(SEC. ID. NO. 11) V A L A G F A T V A Q A D I Q M T Q S>

(SEC. ID. NO. 13) CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG AGT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA

(SEC. ID. NO. 11) P S S L S A S V G D R V T I T C R A S>

(SEC. ID. NO. 13) CAG GAC ATC GCG GGT AGC CGT AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
GTC CTG TAG CCG CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CCG TAG TTC

(SEC. ID. NO. 11) Q D I A G S L N W L Q Q K P G K A I K>

(SEC. ID. NO. 13) CCG CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
GCG GAG TAG ATA CCG TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG

(SEC. ID. NO. 11) R L I Y A T S S L D S G V P K R F S G>

(SEC. ID. NO. 13) AGT CCG AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC GTT CTA AAG

(SEC. ID. NO. 11) S R S G S D Y T L T I S S L Q P E D F>

(SEC. ID. NO. 13) GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA

(SEC. ID. NO. 11) A T Y Y C L Q Y G S F P P T F G Q G T>

(SEC. ID. NO. 13) AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CCG CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA

(SEC. ID. NO. 11) K V E I K R T V A A P S V F I F P P S>

(SEC. ID. NO. 13) GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA

(SEC. ID. NO. 11) D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y>

(SEC. ID. NO. 13) CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AAG

(SEC. ID. NO. 11) P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S>

(SEC. ID. NO. 13) CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG

(SEC. ID. NO. 11) Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T>

(SEC. ID. NO. 13) CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG

(SEC. ID. NO. 11) L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T>

(SEC. ID. NO. 13) CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT

(SEC. ID. NO. 11) H Q G L S S P V T K S F N R G E C >

101

Figura 5: Cadena Pesada, Incluyendo secuencias de señal

(SEC. ID. NO. 14) ATG AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
TAC TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG CAC CGC GTT
(SEC. ID. NO. 12) M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q>

(SEC. ID. NO. 14) GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG
CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC
(SEC. ID. NO. 12) A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L>

(SEC. ID. NO. 14) CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC GGT ATG TCC TGG GTG
GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG CCATACAGG ACC CAC
(SEC. ID. NO. 12) R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V>

(SEC. ID. NO. 14) CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT ACG TCC GGA GGC AGC
GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA TGC AGG CCT CCG TCG
(SEC. ID. NO. 12) R Q A P G K G L E W V A T I T S G G S>

(SEC. ID. NO. 14) TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA
ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTG CCG GCA AAG TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT
(SEC. ID. NO. 12) Y T Y Y V D S V K G R F T I S R D N A>

(SEC. ID. NO. 14) AAG AAT ACC GTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CCG GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT
TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAG ATA
(SEC. ID. NO. 12) K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y>

(SEC. ID. NO. 14) TAC TGT GTA CCG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG
ATG ACA CAT GGC TAG CCG CTT CTG CCG AAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC
(SEC. ID. NO. 12) Y C V R I G E D A L D Y W G Q G T L Y>

(SEC. ID. NO. 14) ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG
(SEC. ID. NO. 12) T V S S A S T K G P S V F P L A P S S>

(SEC. ID. NO. 14) AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
TTC TCG TGG AGA CCC CCG TGT CCG CCG GAC CCG ACG GAC CAG TTG CTG ATG AAG GGG
(SEC. ID. NO. 12) K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P>

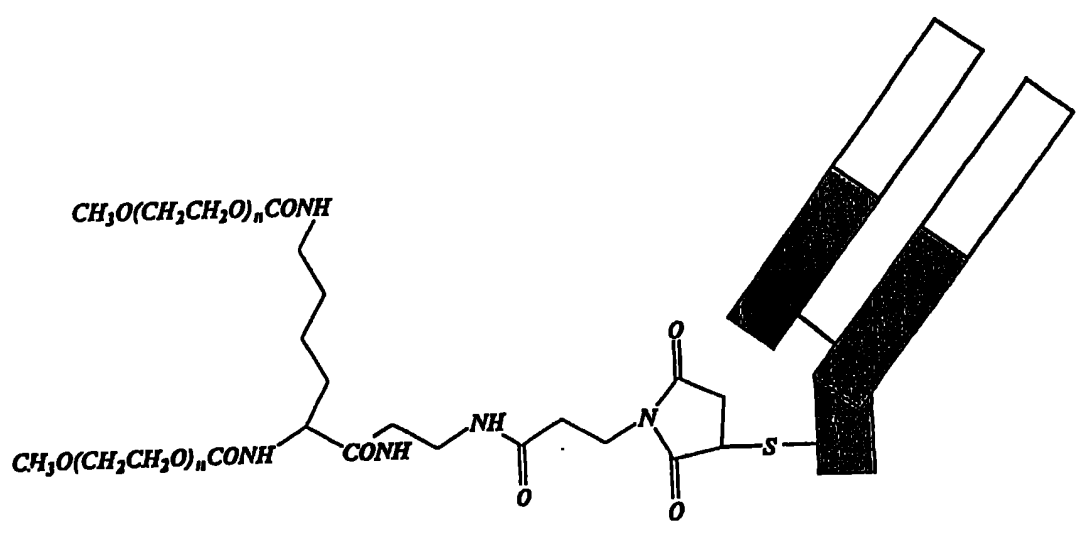
(SEC. ID. NO. 14) GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC
CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CCG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG
(SEC. ID. NO. 12) E P V T V S W N S G A L T S G V H T F>

(SEC. ID. NO. 14) CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG
(SEC. ID. NO. 12) P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P>

(SEC. ID. NO. 14) TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
AGG TCG TCG AAC CCG TGG GTC TGG ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG
(SEC. ID. NO. 12) S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N>

(SEC. ID. NO. 14) ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC
TGG TTC CAG CTG TTG TTT CAA CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG CCG
(SEC. ID. NO. 12) T K V D K K V E P K S C D K T H T C A>

(SEC. ID. NO. 14) GCG TGA
CGC ACT
(SEC. ID. NO. 14) A >



102

Figura 7:

gH3 (SEC. ID. No: 15)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTTYV
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLLTVSS

gL3 (SEC. ID. No: 16)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWLQQKPGKAIRLIYATSSLD SGVPKRFSG
SRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

105

Figura 9: Secuencia de proteína de los Injertos VH y VL designados

Cadena Pesada

(SEC. ID. NO. 17)

gH1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH1 RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIGEDALDYWGQGTLLTVSS

(SEC. ID. NO. 18)

gH2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH2 RFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLLTVSS

(SEC. ID. NO. 19)

gH3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDSVKG
gH3 RFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLLTVSS

Cadena Liviana

(SEC. ID. NO. 20)

gL1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL1 GVPKRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

(SEC. ID. NO. 21)

gL2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL2 GVPKRFSGSRSGDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

(SEC. ID. NO. 22)

gL3 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL3 GVPKRFSGSRSGDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

Figura 10: Diseño de genes

Secuencia gH1 (SEC. ID. NO. 23)

Hind III 20 30 40 50 60
GAATAAAAGC TTGCCGCCAC C ATG AAG ATG TGG TTA AAC TGG GTT TTC CTT GCC CTC ATT
CTTATTTTCG AACGGCGGTG G TAC TTC TAC ACC AAT TTG ACC CAA AAG GAA CGG GAG TAA
M K M W L N W V F L A L P

70 80 PvuII 100 110
TTA AAA GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG
AAT TTT CCA CAG GTC ACA CTC CAC GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC CAA CAG GTC
L K G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q

120 130 140 150 160 170
CCT GGA GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC
GGA CCT CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG
P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y

180 190 200 210 220 230
GGT ATG TCC TGG GTG CCG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT
CCA TAC AGG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA
G M S W V R Q A P G K G L E W V A T P

BspEI 250 260 270 280
ACG TCG GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC CCG GAC ACC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT
TGC AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG GGC CTG TGG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA
T S G G S Y T Y Y P D T V K G R F T P

290 XmaI 300 310 320 330 340
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT AGC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TCG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E

350 360 370 380 MluI 390 400
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GCA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CGT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC CTG ATG ACC CCT
D T A V Y Y C A R I G E D A L D Y W G

410 420 430 440 ApaI 450
CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA AGA AA
GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT TCT TT
Q G T L V T V S S A S T K G P

Secuencia gL1 (SEC. ID. NO. 24)

SfuI 20 30 40 50 60
GGATGATTCG AAGCCGCCAC C ATG AGG ACC CCT GCT CAG ATT CTT GGC TTC TTG TTG CTC
CCTAGTAAGC TTCGGCGGTG G TAC TCC TGG GGA CGA GTC TAA GAA CCG AAG AAC AAC GAG
M R T P A Q I L G F L L L

70 80 EcoRV 90 100 110
TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT CCA AGC AGT CTC TCC
AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA GGT TCG TCA GAG AGG
L F P G T R C D I Q M T Q S P S S L S

120 130 140 150 160 170
GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC GCG GGT
CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA GTC CTG TAG CGC CCA
A S V G D R V T I T C R A S Q D I A G

180 190 200 210 220 230
AGC CTG AAC TGG TAT CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCC AAG CGC CTC ATC TAT GCG
TCG GAC TTG ACC ATA GTC GTT TTT GGC CCG TTT CCG GGG TTC GCG GAG TAG ATA CGC
S L N W Y Q Q K P G K A P K R L I Y A

10.7

AstII 240 250 260 270 280
ACG TGC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA TCT CGT TTC AGT GGC AGT GGC AGC GGT ACT
TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT AGA GCA AAG TCA CCG TCA CCG TCG CCA TGA
T S S L D S G V P S R F S G S G S G T>

280 300 BamBI 320 330 340
GAA TTT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC GCC ACT TAC TAT TGT
CTT AAA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG CCG TGA ATG ATA ACA
E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C>

350 360 370 380 390 400
CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA
GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT
L Q Y G S F P P T F G Q G T K V E I K>

BaNI 410
CGT ACG GC GTGC
GCA TGC CG CACG
R T>

108

Figura 11: Oligonucleótidos para el ensamblaje de genes

gL1 F1 (SEC. ID. NO. 25)
GGATGATTGGAAGCCGCCAC

gL1 F2 (SEC. ID. NO. 26)
TCCAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGAC
TATTACCTGTC

gL1 F3 (SEC. ID. NO. 27)
CAAAAACCGGGCAAAGCCCCCAAGCGCCTCATCTATCGACGTCCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCATCTCGTTTC
AGTGGCAGTGGC

gL1 F4 (SEC. ID. NO. 28)
AGATTTCCGCCACTTACTATTGTCTGCAATATGGCAGCTTCCTCCGACCTTCGGTCAGGGCACTAAAGTAGAAATCA
AACGTACGGCGTGC

gL1 R1 (SEC. ID. NO. 29)
GCACGCCGTACGTTTGATTTTC

gL1 R2 (SEC. ID. NO. 30)
GACAATAGTAAGTGGCGAAATCTTCCGGCTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTAAATTCAGTACCGCTGCCACTGCC
ACTGAAACGAG

gL1 R3 (SEC. ID. NO. 31)
GGGGCTTTGCCCGGTTTTTGTGATACCAAGTTCAGGCTACCCGCGATGTCTGACTGGCAGCAGAGTAAT
AGTCACACGATC

gL1 R4 (SEC. ID. NO. 32)
GATATCACATCTGTACCTGGAAACAAGAGCAACAAGAAGCCAAGAATCTGAGCAGGGGTCTCATGGTGGCGGC
TTCGAATCATCC

gH1 F1 (SEC. ID. NO. 33)
GAATAAAGCTTGCCGCCACC

gH1 F2 (SEC. ID. NO. 34)
TCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGT
GCAGCAAGCGGCTTAC

gH1 F3 (SEC. ID. NO. 35)
AGTGGGTGGCAACCATTACGTCCGGAGGCAGCTATACATACTACCCGACACCGTCAAGGGCCGTTTCACCATTTTC
CCGGGACAATGCAA

gH1 F4 (SEC. ID. NO. 36)
CTATTACTGTGCACGGATCGGCCAAGACGCGTTGGACTACTGGGACAGGGGACCCTTGTGACAGTCTCCTCTGC
TTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

gH1 R1 (SEC. ID. NO. 37)
TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

gH1 R2 (SEC. ID. NO. 38)
CCGATCCGTGCACAGTAATAGACTGCTGTGTCTCTGCGCGAGAGAGTTCATCTGGAGGTAAAGGCTATTCTTTG
CATTGTCCCGGGAATGG

gH1 R3 (SEC. ID. NO. 39)
ACGTAATGGTTGCCACCCACTCCAGGCCCTTCCAGGTGCCTGCCGCACCCAGGACATACCGTAAGAGGAAAAGG
TGAAGCCGCTTGCTGCACA

gH1 R4 (SEC. ID. NO. 40)
CAGCTGCACCTCACACTGGACACCTTTTAAATGAGGGCAAGGAAAACCCAGTTTAACCACATCTTCATGGTGGCG
GCAAGCTTTTATTC

109

Figura 12: Plásmido pCR2.1 (gH1) y pCR2.1 (gL1)

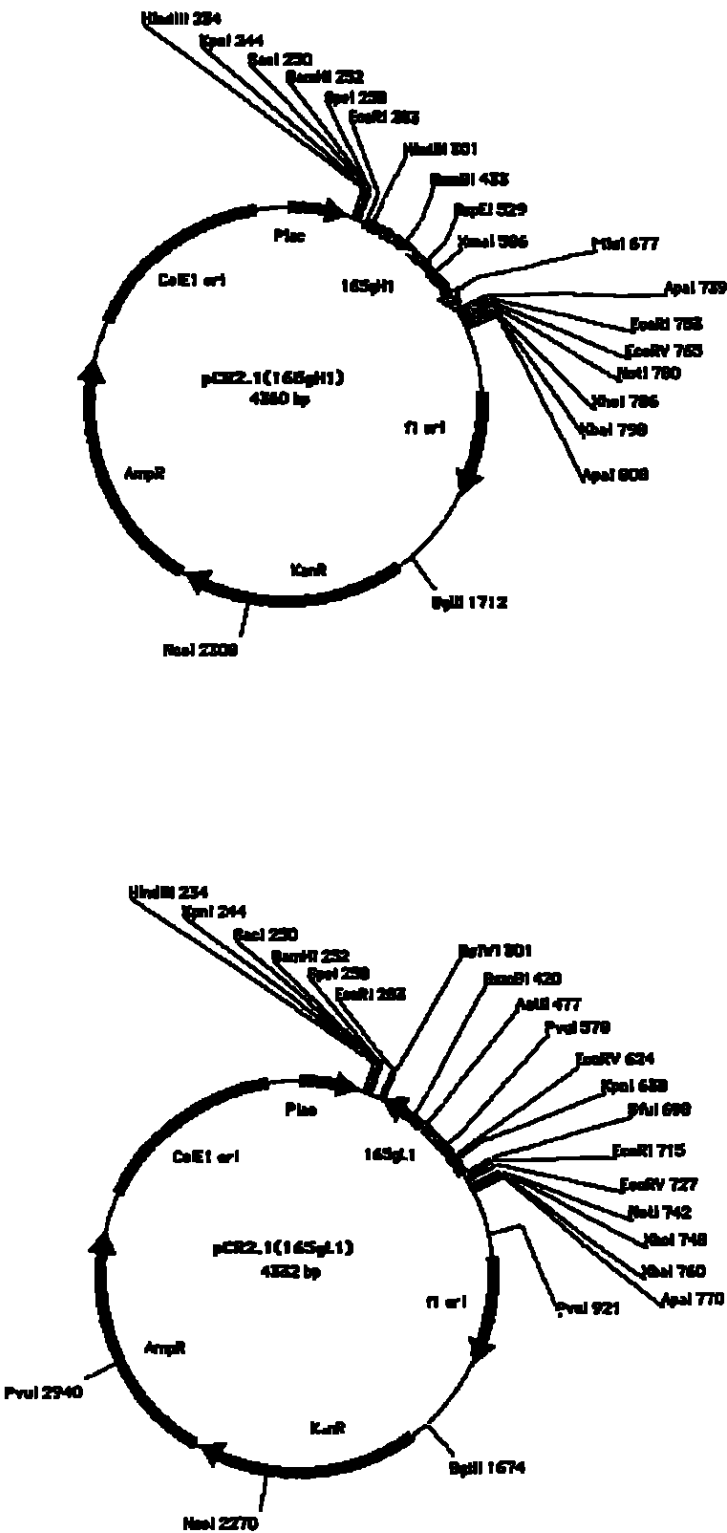


Figura 13: Cartuchos de oligonucleótido para construcción de gH2, gH3, gL2, gL3.

110

Cartucho gH2 (SEC. ID. NO. 41)

XmaI 10 20 30 40 50
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
S R D N A K N I L Y L Q M N S L R A E>

60 70 80 90 MluI
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GTA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC
D T A V Y Y C Y R I G E D A L>

Cartucho gH3 (SEC. ID. NO. 42)

BspEI 10 20 30 40 50
TCC GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC
AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG
S G G S Y T Y Y Y D S V K G R F T I S>

XmaI
CGG GAC
GCC CTG
R D>

Cartucho gL2 (SEC. ID. NO. 43)

AclI 10 20 30 40 50
GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC AGT CGC AGC GGT
CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG TCA GCG TCG CCA
A T S S L D S G V P K R F S G S R S G>

60 70 80 BamBI 90
TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG
AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC
S D Y T L T I S S L Q>

Cartucho gL3 (SEC. ID. NO. 44)

PvuI 10 20 30 40 50
GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC
CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CCG TCA GTC CTG TAG CCG CCA TCG GAC TTG
G D R V T I T C R A S Q D I A G S L N>

60 70 80 90 100 AatII
TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC
ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CCG TAG TTC GCG GAG TAG ATA CCG TGC AGG
W L Q Q K P G K A L K R L I Y A T S>

Los residuos mencionados representan amino ácidos cambiados comparados a la secuencia matriz.

Figura 14: Pares de oligonucleótidos para la construcción de gH2, gH3, gL2, gL3 .

11

gH2T (SEC. ID. NO. 45)
CCGGGACAATGCAAAGAATACCCCTTTACCTCCAGATGAACTCTCTCCGCGCAGAGGACACAGCAGTCTATTACTGT
GTACGGATCGGCGAAGA

gH2B (SEC. ID. NO. 46)
CGCGTCTTCGCCGATCCGTACACAGTAATAGACTGCTGTGTCTCTGCGCGGAGAGAGTTTCATCTGGAGGTAAAG
GGTATTCTTTGCATTGTC

gH3T (SEC. ID. NO. 47)
CCGGAGGCAGCTATACATACTACGTGGACAGCGTCAAGGGCCGTTTCACCATTTTC

gH3B (SEC. ID. NO. 48)
CCGGGAAATGGTGAAACGGCCCTTGACGCTGTCCACGTAGTATGTATAGCTGCCT

gL2T (SEC. ID. NO. 49)
CCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCAAAACGTTTCAGTGGCAGTCGCAGCGGTTCTGACTATACCCTCACAATTTGTC
TCT

gL2B (SEC. ID. NO. 50)
CTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTATAGTCAGAACCGCTGCGACTGCCACTGAAACGTTTTGGCACACCGCTATC
CAGGCTGGACGT

gL3T (SEC. ID. NO. 51)
CGTGTGACTATTACCTGTGCGTCCAGTCAGGACATCGCGGTAGCCTGAACTGGTTGCAGCAAAAACCGGGCAAA
GCCATCAAGCGCCTCATCTATGCGACGT

gH3B (SEC. ID. NO. 52)
CGCATAGATGAGGCGCTTGATGGCTTTGCCCGTTTTTGGTGAACCAAGTTTCAGGCTACCCGCGATGTCTTGACTG
GCACGACAGGTAATAGTCACACGAT

Figura 15 : Plásmidos de Expresión CHO

1/2

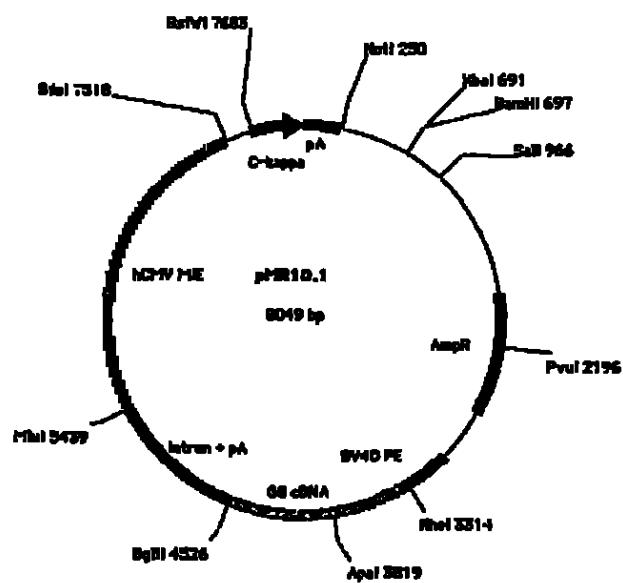
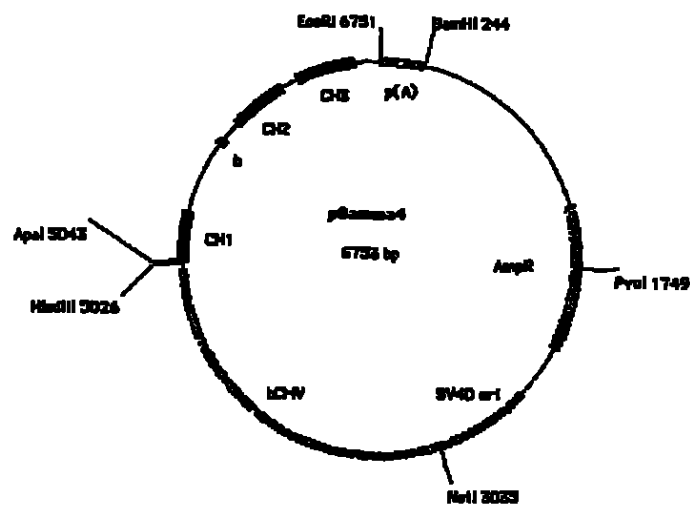


Figura 16: Mapa pTTOD (Fab' IGS-3)

13

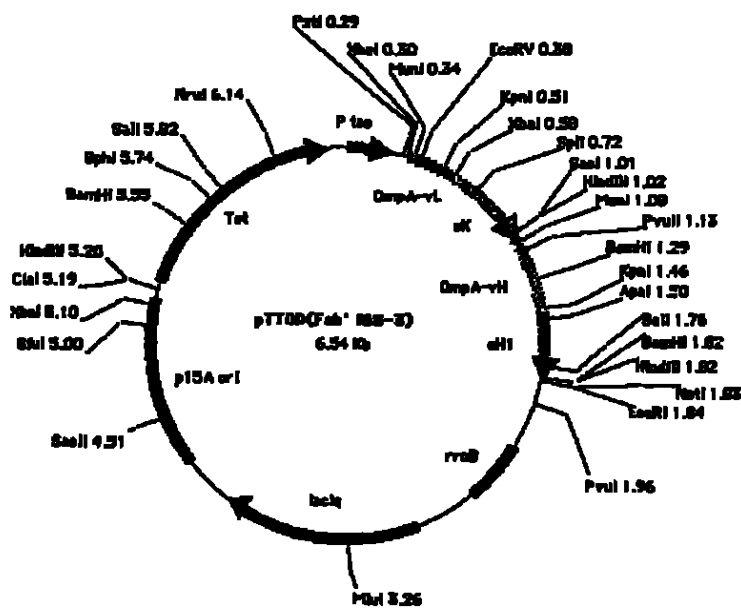


Figura 17: Secuencias IGS

(SEC. ID. NO. 53)

IGS-1: Espaço Intergénico = -1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA GGA, GAG, TGT, TAATTG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G
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 → Principio de la secuencia OmpA →

(SEC. ID. NO. 54)

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

(SEC. ID. NO. 55)

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

Figura 18: Fermentación de Fab'

13

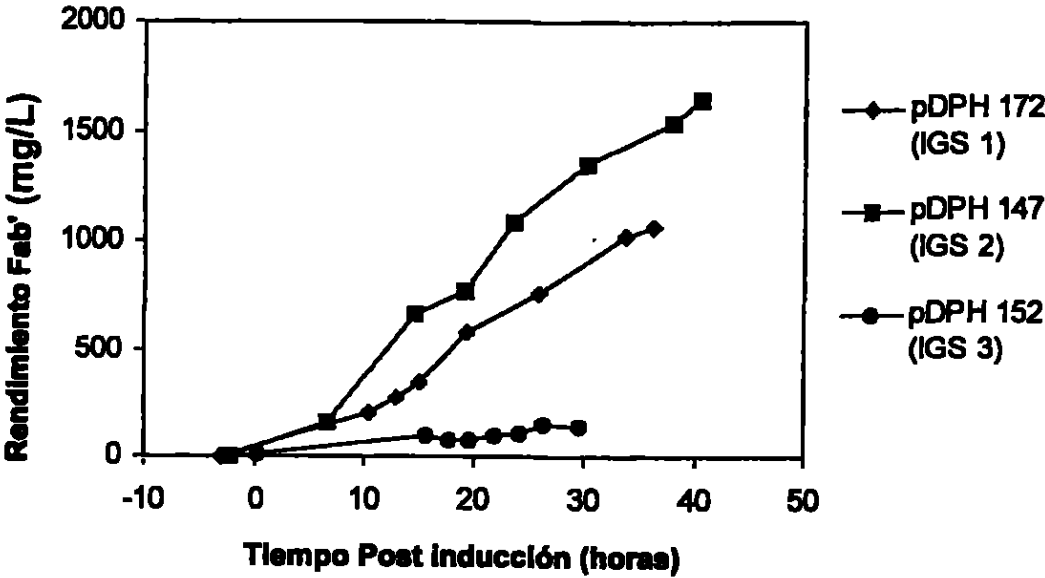


Figura 19: Secuencia de Codificación y Flanqueo de Fab' CDP791
(SEC. ID. NO. 58)

1/6

10 20 30 40 50 60 70
AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT CTGGCCTCAG GCAGCCATCG
TTAAGAGTAC AAAGTGTGCA ATAGTAGCTG ACGTGCCACG TGGTTACGAA GACCGCAGTC CGTCGGTAGC

80 90 100 110 120 130 140
GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCGTT
CTTCGACACC ATACCGACAC GTCCAGCATT TAGTGACGTA TTAAGCACAG CGAGTTCGCG GTGAGGGCAA

150 160 170 180 190 200 210
CTGGATAATG TTTTTGCGC CGACATCATA ACGGTTCTGG CAAATATTCT GAAATGAGCT GTTGACAATT
GACCTATTAC AAAAAACGCG GCTGTAGTAT TGCCAAGACC GTTTATAAGA CTTTACTCGA CAACTGTAA

220 230 240 250 260 270 280
AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTCAC ACAGGAAACA GCGATGAGCT
TTAGTAGCCG AGCATATTAC ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTAAAGTG TGTCTTTGT CGCTACTCGA

290 300 310 320 330 340
TGGCTGCAGG TCGAGTTCTA GATAACGAGG CGTAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
ACCGACGTCC AGCTCAAGAT CTATTGCTCC GCATTTT TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT
M K K T A I A I A>

350 360 370 380 390 400
GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA
V A L A G F A T V A Q A D I Q M T Q S>

410 420 430 440 450
CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
GGT TCG TCA GAG AGG CCG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA
P S S L S A S V G D R V T I T C R A S>

460 470 480 490 500 510
CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC

Q D I A G S L N W L Q Q K P G K A I K>

520 530 540 550 560 570
CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG
R L I Y A T S S L D S G V P K R F S G>

580 590 600 610 620 630
AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG
S R S G S D Y T L T I S S L Q P E D F>

640 650 660 670 680
GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA
A T Y Y C L Q Y G S F P P T F G Q G T>

690 700 710 720 730 740
AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA
K V E I K R T V A A P S V F I F P P S>

750 760 770 780 790 800
GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y>

810 820 830 840 850
CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG
P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S>

860 870 880 890 900 910
CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T>

920 930 940 950 960 970
CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG
L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T>

980 990 1000 1010 1020 1030
CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA A ATG
GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT T TAC
H Q G L S S P V T K S F N R G E C T>

M>

1040 1050 1060 1070 1080
AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG CAC CGC GTT
K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT GGA GGC AGC CTG
CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC
A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC GGT ATG TCC TGG GTG
GCA GAC AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG CCA TAC AGG ACC CAC
R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V>

1210 1220 1230 1240 1250
CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT ACG TCC GGA GGC AGC
GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA TGC AGG CCT CCG TCG
R Q A P G K G L E W V A T I T S G G S>

1260 1270 1280 1290 1300 1310
TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA

18

ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT
Y T Y Y V D S V K G R F T I S R D N A>

1320 1330 1340 1350 1360 1370
AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TGT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT
TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAG ATA
K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y>

1380 1390 1400 1410 1420
TAC TGT GTA CCG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG
ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC
Y C V R I G E D A L D Y W G Q G T V L>

1430 1440 1450 1460 1470 1480
ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG
T V S S A S T K G P S V F P L A P S S>

1490 1500 1510 1520 1530 1540
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
TTC TCG TGG AGA CCC CCG TGT CGC CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG
K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P>

1550 1560 1570 1580 1590 1600
GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC
CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F>

1610 1620 1630 1640 1650
CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG
P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P>

1660 1670 1680 1690 1700 1710
TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
AGG TCG TCG AAC CCG TGG GTC TGG ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG
S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N>

1720 1730 1740 1750 1760 1770
ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC
TGG TTC CAG CTG TTC TTT CAA CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG CGG
T K V D K K V E P K S C D K T H T C A>

1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
GCG TGA TGA GGATCCAAGC TTGCGGCCGC GAATTCACGTG GCCGTCGTTT TACAACGTCG TGA CTGGGAA
CGC ACT ACT CCTAGGTTCTG AACGCCGGCG CTTAAGTGAC CCGCAGCAAA ATGTTGCAGC ACTGACCCCT
A >

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910
AACCCTGGCG TTACCCAACT TAATCGCCTT GCAGCACATC CCCCTTTCGC CAGCTCGCGT AATAGCGAAG
TTGGGACCGC AATGGGTGGA ATTAGCGGAA CGTCGTGTAG GGGGAAAGCG GTCGAGCGCA TTATCGCTTC

1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
AGGCCCGCAC CGATCGCCCT TCCCAACAGT TCGCGAGCCT GAATGGCGAA TGGCGCCTGA TGCGGTATTT
TCCGGGCGTG GCTAGCGGGA AGGGTTGTCA ACGCGTCGGA CTTACCGCTT ACCGCGGACT ACGCCATAAA

1990 2000
TCTCCTTACG CATCTGTGCG
AGAGGAATGC GTAGACACGC

Figura 20: Resultados de Radioinmunoensayo

J/4

BLOQUEO DE LA UNIÓN 125I FCVE AL IgFC HUMANO DE RDQ

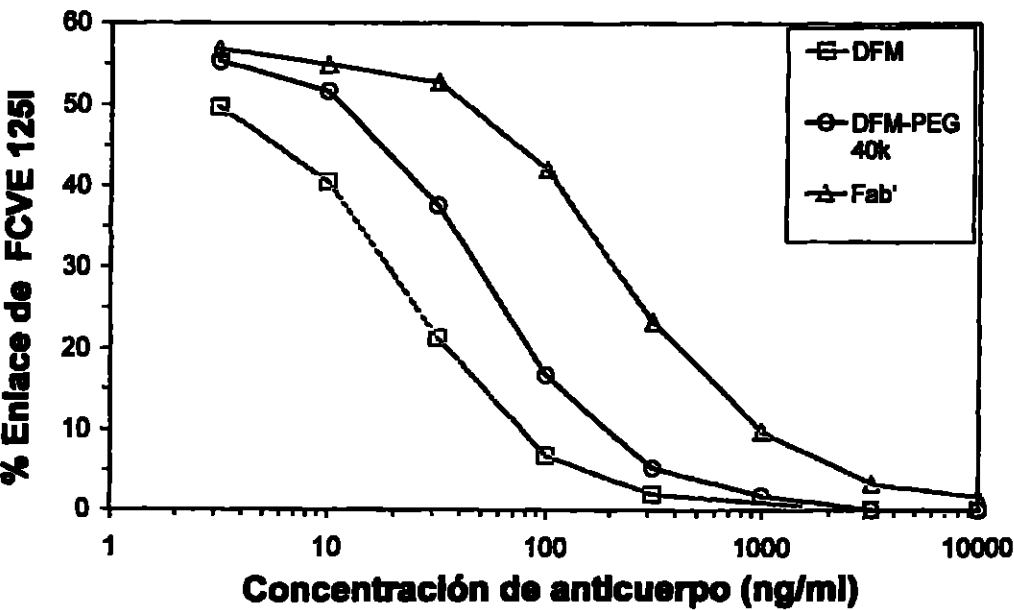


Figura 21: Secuencia de Proteína de la cadena injertada a gH3

120

Secuencia de anticuerpo de cadena pesada (SEC. ID. NO. 57)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSY
TYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK*

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) P028302WO

Box No. I TITLE OF INVENTION	
BIOLOGICAL PRODUCTS	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) CELLTECH R&D LIMITED 208 BATH ROAD SLOUGH BERKSHIRE SL1 3WE GB	
Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: GB State (that is, country) of residence: GB	
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) POPPELWELL, Andrew George 208 BATH ROAD SLOUGH BERKSHIRE SL1 3WE GB	
This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: GB State (that is, country) of residence: GB	
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) MERCER, Christopher Paul CARPMAELS & RANSFORD 43 BLOOMSBURY SQUARE LONDON WC1A 2RA GB	
Telephone No. 020 7242-8692 Facsimile No. 020 7405 4166 Teleprinter No. Agent's registration No. with the Office	
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TICKLE, Simon Peter
208 BATH ROAD
SLOUGH
BERKSHIRE
SL1 3WE
GB

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

GB

State (that is, country) of residence:

GB

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

ZINKEWICH-PEOTTI, Karen
208 BATH ROAD
SLOUGH
BERKSHIRE
SL1 3WE
GB

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

GB

State (that is, country) of residence:

GB

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MORRISON, Robert Kendall
208 BATH ROAD
SL UGH
BERKSHIRE
SL1 3WE
GB

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

GB

State (that is, country) of residence:

GB

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☐ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☐ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
- ☐ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☐ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|--|---|---|
| ☐ AE United Arab Emirates | ☐ GM Gambia | ☐ NZ New Zealand |
| ☐ AG Antigua and Barbuda | ☐ HR Croatia | ☐ OM Oman |
| ☐ AL Albania | ☐ HU Hungary | ☐ PH Philippines |
| ☐ AM Armenia | ☐ ID Indonesia | ☐ PL Poland |
| ☐ AT Austria | ☐ IL Israel | ☐ PT Portugal |
| ☐ AU Australia | ☐ IN India | ☐ RO Romania |
| ☐ AZ Azerbaijan | ☐ IS Iceland | ☐ RU Russian Federation |
| ☐ BA Bosnia and Herzegovina | ☐ JP Japan | |
| ☐ BB Barbados | ☐ KE Kenya | ☐ SD Sudan |
| ☐ BG Bulgaria | ☐ KG Kyrgyzstan | ☐ SE Sweden |
| ☐ BR Brazil | ☐ KP Democratic People's Republic of Korea | ☐ SG Singapore |
| ☐ BY Belarus | ☐ KR Republic of Korea | ☐ SI Slovenia |
| ☐ BZ Belize | ☐ KZ Kazakhstan | ☐ SK Slovakia |
| ☐ CA Canada | ☐ LC Saint Lucia | ☐ SL Sierra Leone |
| ☐ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☐ LK Sri Lanka | ☐ TJ Tajikistan |
| ☐ CN China | ☐ LR Liberia | ☐ TM Turkmenistan |
| ☐ CO Colombia | ☐ LS Lesotho | ☐ TN Tunisia |
| ☐ CR Costa Rica | ☐ LT Lithuania | ☐ TR Turkey |
| ☐ CU Cuba | ☐ LU Luxembourg | ☐ TT Trinidad and Tobago |
| ☐ CZ Czech Republic | ☐ LV Latvia | |
| ☐ DE Germany | ☐ MA Morocco | ☐ TZ United Republic of Tanzania |
| ☐ DK Denmark | ☐ MD Republic of Moldova | ☐ UA Ukraine |
| ☐ DM Dominica | | ☐ UG Uganda |
| ☐ DZ Algeria | ☐ MG Madagascar | ☐ US United States of America |
| ☐ EC Ecuador | ☐ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | |
| ☐ EE Estonia | ☐ MN Mongolia | ☐ UZ Uzbekistan |
| ☐ ES Spain | ☐ MW Malawi | ☐ VN Viet Nam |
| ☐ FI Finland | ☐ MX Mexico | ☐ YU Yugoslavia |
| ☐ GB United Kingdom | ☐ MZ Mozambique | ☐ ZA South Africa |
| ☐ GD Grenada | ☐ NO Norway | ☐ ZM Zambia |
| ☐ GE Georgia | | ☐ ZW Zimbabwe |
| ☐ GH Ghana | | |

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐ VC Saint Vincent & the Grenadines ☐
- ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

124

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (Indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*
 - (i) *If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*
 - (ii) *If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*
 - (iii) *If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*
 - (iv) *If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*
 - (v) *If, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;*
 - (vi) *If, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*
2. *If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.*

CONTINUATION BOX NO. IV

JONES, Alan John
 HOWICK, Nicholas Keith
 FISHER, Adrian John
 HALLYBONE, Huw George
 JACKSON, Richard Eric
 HOWARD, Paul Nicholas
 JAMES, Anthony Christopher W.P.
 COCKERTON, Bruce Roger
 MARSHALL, Cameron John
 GOODFELLOW, Hugh Robin

All of Carpmæels & Ransford
 43 Bloomsbury Square
 London WC1A 2RA
 United Kingdom

Tel: 0207 242 8692

Fax: 0207 405 4166

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 10/10/2001 (10th October 2001)	0124317.9	GB		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING		
This international application contains: (a) the following number of sheets in paper form: request (including declaration sheets) : 6 description (excluding sequence listing part) : 26 claims : 5 abstract : 1 drawings : 24 Sub-total number of sheets : 62 sequence listing part of description (actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below) : 62 Total number of sheets : 62 (b) sequence listing part of description filed in computer readable form (i) ☐ only (under Section 801(a)(i)) (ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii)) Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column):	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): 1. ☒ fee calculation sheet : 1 2. ☐ original separate power of attorney : 3. ☐ original general power of attorney : 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: : 5. ☐ statement explaining lack of signature : 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): : 7. ☐ translation of international application into (language): : 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : 9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other)) (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column : 10. ☒ other (specify): 23/77 : 1	Number of items
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 20	Language of filing of the international application: ENGLISH	

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE	
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).	
<i>P. D. Howard</i> MERCER, Christopher Paul Authorised Representative	CHECKED Date: 10.10.02 By: REM <i>Medinat</i>

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

127

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P028302WO	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/GB 02/04619	International filing date (day/month/year) 10/10/2002	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/10/2001
Applicant CELLTECH R&D LIMITED		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☒ furnished subsequently to this Authority in written form.

☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 36.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

20

☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 02/04619

128

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see PCT/ISA/210 annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-40

Group I: an antibody molecule having specificity for human KDR, the DNA sequence which encodes said antibody molecule, a vector containing the DNA sequence, a host cell transformed with said vector, a process for the production of the antibody molecule, and a therapeutic composition comprising said antibody molecule and its use.

2. claim: 41

Group II: a vector designated pTTOD(CDP791) as shown in Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 02/04619

130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K16/28 C12N15/70 A61P19/02	C07K16/46 C12N1/21 A61P35/04
A61K39/395	A61K47/48	C12N15/13 G01N33/577 A61P17/06 A61P37/00
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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WITTE L ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES TARGETING THE VEGF RECEPTOR-2 (FLK1/KDR) AS AN ANTI-ANGIOGENIC THERAPEUTIC STRATEGY" CANCER AND METASTASIS REVIEWS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 17, no. 2, 1998, pages 155-161, XP000940443 ISSN: 0167-7659 abstract page 155, left-hand column, paragraph 1 page 160, right-hand column, paragraph 1 the whole document	1-21, 28-40
Y	----- -/-	22-27
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 September 2003		Date of mailing of the international search report 09.01.04
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 02/04619

B1

C. (continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HICKLIN DANIEL J ET AL: "Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis." DRUG DISCOVERY TODAY, vol. 6, no. 10, 2001, pages 517-528, XP002254076 ISSN: 1359-6446 page 520, right-hand column, paragraph 5 - page 522, left-hand column, paragraph 2 the whole document	1-21, 28-40
Y		22-27
X	ZHU Z ET AL: "INHIBITION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR INDUCED MITOGENESIS OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS BY A CHIMERIC ANTI-KINASE INSERT DOMAIN-CONTAINING RECEPTOR ANTIBODY" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 136, no. 2, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 203-213, XP000907699 ISSN: 0304-3835 abstract the whole document	1-21, 28-40
Y		22-27
X	WO 00/44777 A (IMCLONE SYSTEMS INC ;WITTE LARRY (US); ZHU ZHENPING (US)) 3 August 2000 (2000-08-03) page 1, line 8 - line 9 the whole document	1-21, 28-40
Y	page 1, line 26 page 5, line 4 - line 9 page 5, line 21 page 9, line 20 - line 27 page 9, line 28 - page 10, line 7 claims 48,49	22-27
X	WO 98/11223 A (MARTINY BARON GEORG ;SCHERING AG (DE); MENRAD ANDREAS (DE); TOTZKE) 19 March 1998 (1998-03-19) abstract page 2, line 13 - line 14 page 3, line 10 - line 13 the whole document	1-21, 28-40
A		22-27
X	EP 1 086 705 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 28 March 2001 (2001-03-28) page 4, line 4 - line 5 page 4, line 53 - line 57 page 5, line 43 - line 48 the whole document	1-21, 28-40
A		22-27
Y	US 6 133 426 A (LEONG STEVEN R ET AL) 17 October 2000 (2000-10-17) column 121 - column 122	22-27
	-/-	

132

C₁ (continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HURWITZ ESTHER ET AL: "Inhibition of tumor growth by poly(ethylene glycol) derivatives of anti-ErbB2 antibodies." CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 49, no. 4-5, July 2000 (2000-07), pages 226-234, XP002254077 ISSN: 0340-7004 abstract	22-27
A	DECKERT P MARKUS ET AL: "Pharmacokinetics and microdistribution of polyethylene glycol-modified humanized A33 antibody targeting colon cancer xenografts." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 87, no. 3, 2000, pages 382-390, XP002254078 ISSN: 0020-7136 abstract	22-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 02/04619

133

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044777	A	03-08-2000	AU 3475100 A	18-08-2000
			CA 2361553 A1	03-08-2000
			CN 1345334 T	17-04-2002
			EP 1151002 A1	07-11-2001
			JP 2002536968 T	05-11-2002
			WO 0044777 A1	03-08-2000
WO 9811223	A	19-03-1998	DE 19638745 A1	12-03-1998
			AU 730287 B2	01-03-2001
			AU 4622297 A	02-04-1998
			CA 2265927 A1	19-03-1998
			WO 9811223 A1	19-03-1998
			EP 0925359 A1	30-06-1999
			HU 9904052 A2	28-03-2000
			JP 2001501920 T	13-02-2001
			NO 991162 A	06-05-1999
			PL 332034 A1	16-08-1999
			US 6344339 B1	05-02-2002
			ZA 9708204 A	03-03-1998
EP 1086705	A	28-03-2001	AU 3850299 A	06-12-1999
			CA 2328893 A1	25-11-1999
			EP 1086705 A1	28-03-2001
			WO 9959636 A1	25-11-1999
			US 2003175271 A1	18-09-2003
US 6133426	A	17-10-2000	US 6025158 A	15-02-2000
			US 6458355 B1	01-10-2002
			US 6468532 B1	22-10-2002
			US 2003021790 A1	30-01-2003

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ EP

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION			Applicant's or agent's file reference P028302WO
International application No. PCT/GB02/04619	International filing date (day/month/year) 10 October 2002	(Earliest) Priority date (day/month/year) 10 October 2001	
Title of invention BIOLOGICAL PRODUCTS			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) CELLTECH R & D LIMITED 208 BATH ROAD SLOUGH BERKSHIRE SL1 3WE GB		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		Teleprinter No.	
		Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: GB		State (that is, country) of residence: GB	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) POPPELWELL, Andrew George 208 BATH ROAD SLOUGH BERKSHIRE SL1 3WE GB			
State (that is, country) of nationality: GB		State (that is, country) of residence: GB	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) TICKLE, Simon Peter 208 BATH ROAD SLOUGH BERKSHIRE SL1 3WE GB			
State (that is, country) of nationality: GB		State (that is, country) of residence: GB	
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ZINKEWICH-PEOTTI, Karen
208 BATH ROAD
SLOUGH
BERKSHIRE
SL1 3WE
GBState (that is, country) of nationality:
GBState (that is, country) of residence:
GB

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

MORRISON, Robert Kendall
208 BATH ROAD
SLOUGH
BERKSHIRE
SL1 3WE
GBState (that is, country) of nationality:
GBState (that is, country) of residence:
GB

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)MERCER, Christopher Paul
CARPMAELS & RANSFORD
43 BLOOMSBURY SQUARE
LONDON WC1A 2RA
GB

Telephone No.

020 7242-8692

Facsimile No.

020 7405-4166

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION****Statement concerning amendments:***

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: **ENGLISH**☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☒ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| received | not received |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|---|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listings in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | 8. ☐ other (specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).



MERCER, Christopher Paul

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply. ☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

0208 16.3.04
PATENT COOPERATION TREATY

✓DMC

138

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

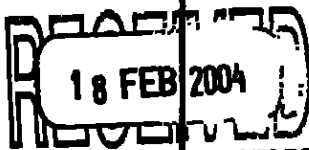
PCT

To:

Mercer, Christopher P.
CARPMAELS & RANSFORD
43 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
GRANDE BRETAGNE

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)



Date of mailing
(day/month/year)

16/02/2004

Applicant's or agent's file reference
P028302WO

REPLY DUE

within 1 / 00 months/days
from the above date of mailing

International application No.

PCT/GB02/04619

International filing date (day/month/year)

10/10/2002

Priority date (day/month/year)

10/10/2001

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

C07K16/28

Applicant

CELLTECH R&D LIMITED et al.

1. This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(b) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4. For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis. For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 10/02/2004

Name and mailing address of the IPEA/

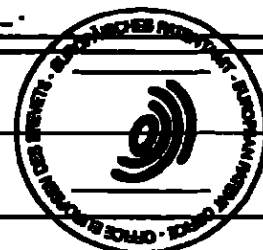


European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

Examiner

Formalities officer
(incl. extension of time limits)
Tel. (+49-89) 2399 2828



139

I. Basis of the opinion

The basis of this written opinion is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT; see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

1. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:
2. In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).
3. If amendments are filed, the applicant should comply with the requirements of Rule 66.8 PCT and indicate the basis of the amendments in the documents of the application as originally filed (Article 34 (2) (b) PCT) otherwise these amendments may not be taken into consideration for the establishment of the international preliminary examination report. The attention of the applicant is drawn to the fact that if the application contains an unnecessary plurality of independent claims, no examination of any of the claims will be carried out.

NB: Should the applicant decide to request detailed substantive examination, then an international preliminary examination report will normally be established directly. Exceptionally the examiner may draw up a second written opinion, should this be explicitly requested.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

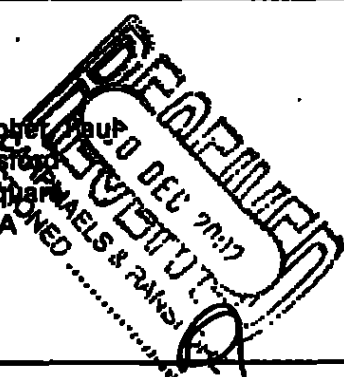
NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MERCER, Christopher
Carpmaels & Ransford
43 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
United Kingdom

Date of mailing (day/month/year) 07 December 2002 (07.12.02)	
Applicant's or agent's file reference P028302WO	
International application No. PCT/GB02/04619	IMPORTANT NOTIFICATION
International publication date (day/month/year) Not yet published	International filing date (day/month/year) 10 October 2002 (10.10.02) Priority date (day/month/year) 10 October 2001 (10.10.01)
Applicant CELLTECH R & D LIMITED et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
10 Octo 2001 (10.10.01)	0124317.9	GB	06 Nove 2002 (06.11.02)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Josefina DE LOS REYES Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PC/1/GB02/04619

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES.

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

MERCER, Christopher, Paul
Carpmaels & Ransford
43 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
ROYAUME-UNI

141

Date of mailing(day/month/year)
17 April 2003 (17.04.03)

Applicant's or agent's file reference
P028302WO

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/GB02/04619

International filing date(day/month/year)
10 October 2002 (10.10.02)

Priority date(day/month/year)
10 October 2001 (10.10.01)

Applicant

CELLTECH R & D LIMITED

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 17 April 2003 (17.04.03) under No. 03/031475

4. **TIME LIMITS** for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Offices if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Judith Zahra

Facsimile No.(41-22) 740.14.35

Telephone No.(41-22) 338.91.11

Expediente No		04041969	No de Follo
Item		No de unidades	✓
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIÓDICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	5	1
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: *Nota Final*

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 84841969 84883883 Folios: 143
Fecha (RG): 26-04-05-06 17:05:50.
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE KACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2223 DIVISION DE NUEVOS CRECIMIENTOS

143

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 28,813
FECHA : ABRIL 12 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	22136877	12/04/2004	53,734,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 13115-841-002-0

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- 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 o 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 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:

Fecha:

2020
Bogotá D C

30557

Doctor(a)
EMILIO FERRERO.
Apoderado(a)

Oficio N°

ASUNTO:	Radicación N°	04-41969
	Solicitud internacional	PCT/GB02/04619
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 29 1 JUL 2004
202051