



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 04-120665

54. TITULO PRODUCTOS BIOLÓGICOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/28

71. SOLICITANTE CELLTECH R & D LIMITED

DOMICILIO Slough, Berkshire, Inglaterra.

74. APODERADO EMILIO FERRERO
C.C. 438,019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 04120463 00000000 Folios: 1
Fecha (AMB): 2004-11-30 17:35:56
Trámite: 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: **CELLTECH R & D LIMITED**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Inglaterra.

Dirección: 208 Bath Road,
Slough, Berkshire SL1 3WE,
Inglaterra
Domicilio: Slough, Berkshire,
Inglaterra

IDENTIFICACIÓN

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: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Andrew George POPPLEWELL**
Celltech R & D Limited,
208 Bath Road,
Slough, Berkshire SL1 3WE,
Inglaterra

3. **Heather Margaret LADYMAN**
Celltech R & D Limited,
208 Bath Road,
Slough, Berkshire SL1 3WE,
Inglaterra

2. **Simon Peter TICKLE**
Celltech R & D Limited,
208 Bath Road,
Slough, Berkshire SL1 3WE,
Inglaterra

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB03/01934

Fecha: 2 de Mayo de 2003

Publicación Internacional No. WO 03/093320 A2

Fecha: 13 de Noviembre de 2003

6

Título (54)

PRODUCTOS BIOLÓGICOS

7

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

AG K 31 7088

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

2 de Mayo de 2002

(31) Número de Solicitud

0210121.0

9

Comprobante de pago No.: 04 - 87.147

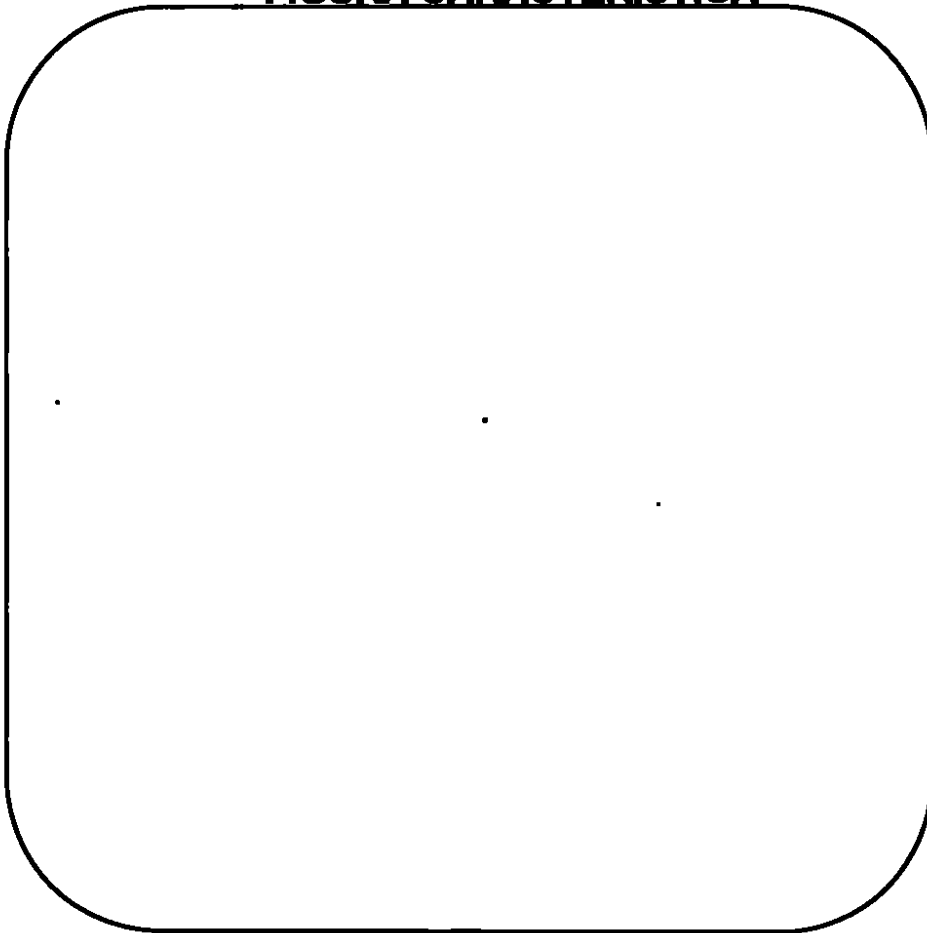
Fecha: 8 de Noviembre de 2004

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 CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

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

13115
6382

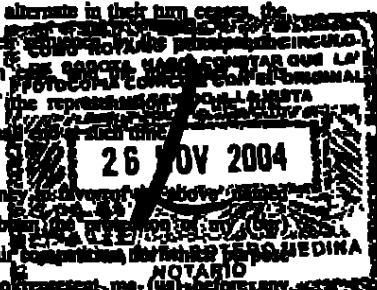
CELLTECH R&D LIMITED
domiciliado (s) en/of **208 BATH ROAD**
SLOUGH, BERKSHIRE SL1 3WE
UNITED KINGDOM

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVALIER, 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 (nuestras) 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 suplentes, 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

is 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 CAVALIER, 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 order, one or others according to the case, assuming it by the sole fact of exercising it, ceasing at that moment the exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn should they be present.

In addition, we grant a Power of Attorney to the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, before the authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment 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,



Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de estos oficiosos.

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

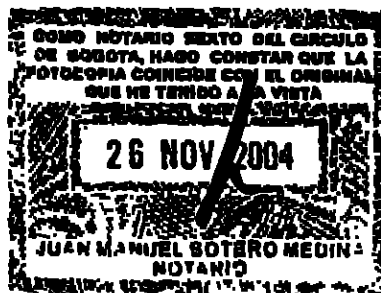
at/in Slough, U.K.

for/by

Firma

Signature

JOHN ANDREW DUNCAN SLATER
COMPANY SECRETARY



ATENTICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL AUTHENTICATION (COMPANY)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de John SLATER

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of JOHN SLATER

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de Secretario de la sociedad de la compañía CELLTECH R.D LTD

is authentic, that the signatory currently acts in the position of Co SECRETARY of the company CELLTECH R-D LTD

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de Inglaterra

a company currently existing and organized under the laws of ENGLAND

que la dirección de dicha compañía es 208 Bath Rd Slough

that the address is 208 BATH RD Slough

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

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

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

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

Dado y firmado en Windsor

Given and signed in Windsor

El 24 Enero 2002

On 24 January 2002

El Notario Público
(Firma-sello)

The Notary Public
(Signature-seal)

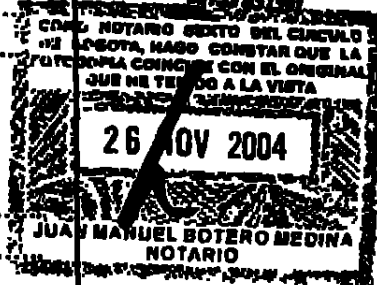
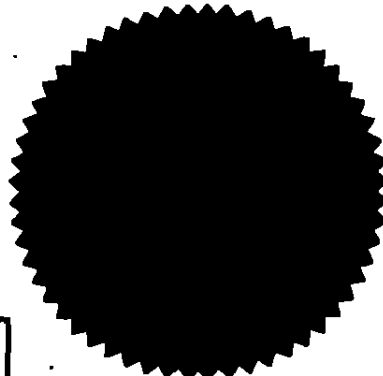
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
2. This public document
3. has been signed by
4. acting in the capacity of
5. bears the seal/stamp of

Certified

6. the
7. at
8. by
9. No.
10. Seal/stamp
11. Signature



6

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

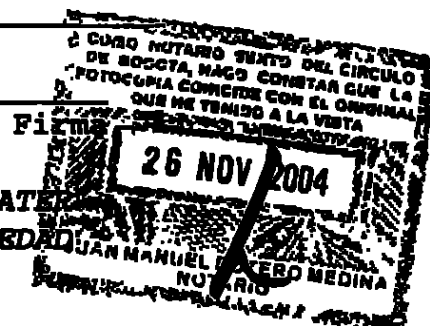
En Slough, Reino Unido

Por _____

Firma Ilegible

Firma

JOHN ANDREW DUNCAN SLATER
SECRETARIO DE LA SOCIEDAD

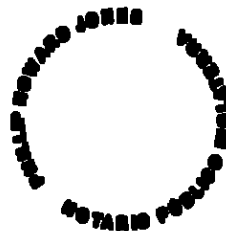


AUTENTICACIÓN NOTARIAL. (SOCIEDAD) en donde se certifica la
anterior firma de JOHN SLATER, así como de su cargo como
Secretario de la Sociedad, compañía actualmente existente y
constituida de acuerdo a las leyes de Inglaterra con dirección en
el 208 BATH RD, SLOUGH. Adicionalmente se certifica que el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

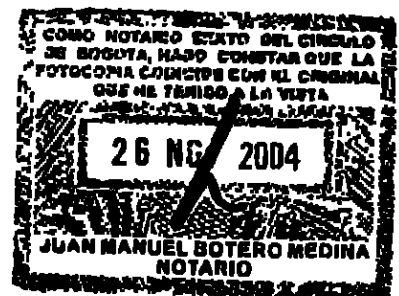
APOSTILLA

(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 Notario Público
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 /

8

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

8. Número/ sous No. **G987139** / 000100

9. Estampilla:

10. Firma: **T.S. Cunningham**

timbre:



Imagen Obtenida por Escáner

Firma Ilegible

LEYENDA: OFICINA DE RELACIONES EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD LONDRES

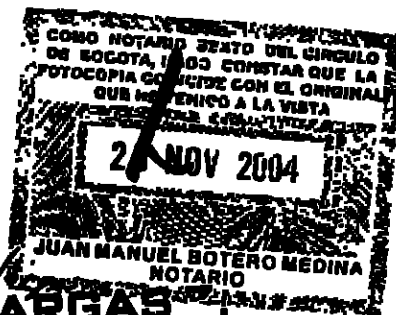
Aparece un sello seco semejante al descrito anteriormente

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

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta
ficina 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

206899

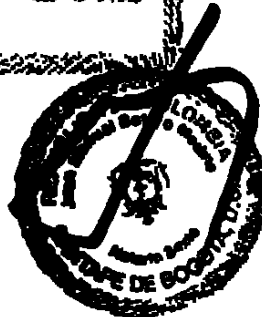
Deco Vargas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPESA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 FEB 14 A 11:31

JEFE DE LEGALIZACIONES
MINISTERIO DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR *Deco Vargas*
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s) _____
ES(SON) AUTENTICAS
SANTAFE DE BOGOTA, 14 FEB 2002



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

PCT

(16) International Publication Number
WO 03/093320 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 16/28,
C12N 15/13, 15/85, 5/10, A61K 39/395, 31/7088, A61P
35/00

(74) Agents: MERCIER, Christopher, Paul et al.; Capronis
& Ransford, 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2BA
(GB).

(21) International Application Number: PCT/GB03/01934

(81) Designated States (national): AR, 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, GR, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 2 May 2003 (02.05.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0210121.0 2 May 2002 (02.05.2002) GB

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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); Celltech R & D Limited, 208
Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). TICKLE,
Simon, Peter (GB/GB); Celltech R & D Limited, 208 Bath
Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). LADYMAN,
Heather, Margaret (GB/GB); Celltech R & D Limited,
208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB).

Published:

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

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

(54) Title: BIOLOGICAL PRODUCTS

(57) Abstract: There is disclosed antibody molecules containing at least one CDR derived from a mouse monoclonal antibody having specificity for human CD22. There is also disclosed a CDR grafted antibody wherein at least one of the CDRs is a modified CDR. Further disclosed are DNA sequences encoding the chains of the antibody molecules, vectors, transformed host cells and uses of the antibody molecules in the treatment of diseases mediated by cells expressing CD22.



WO 03/093320 A2

BIOLOGICAL PRODUCTS

The present invention relates to an antibody molecule having specificity for antigenic determinants of the B lymphocyte antigen, CD22. The present invention also
5 relates to the therapeutic uses of the antibody molecule and methods for producing the antibody molecule.

In a natural 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
10 complementarity determining regions (CDRs). The residues in the variable domains are conventionally numbered according to a system devised by Kabat *et al.* This system is set forth in Kabat *et al.*, 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (hereafter "Kabat *et al. (supra)*"). This numbering system is used in the present specification except where otherwise
15 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
20 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 (CDR-H1), residues 50-65 (CDR-H2) and residues 95-102 (CDR-H3) according to the Kabat
25 numbering.

The CDRs of the light chain variable domain are located at residues 24-34 (CDR-L1), residues 50-56 (CDR-L2) and residues 89-97 (CDR-L3) according to the Kabat numbering.

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

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

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

Riechmann *et al.*, found that the transfer of the CDRs alone (as defined by Kabat
10 (Kabat *et al.* (*supra*) and Wu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 132, 211-250, 1970)) was not sufficient to provide satisfactory antigen binding activity in the CDR-grafted product. It was found that a number of framework residues have to be altered so that they correspond to those of the donor framework region. Proposed criteria for selecting which framework residues need to be altered are described in International Patent Application No. WO 90/07861.

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

Malignant lymphomas are a diverse group of neoplasms. The majority of cases occur in older people. Non-Hodgkins Lymphoma (NHL) is a disease that currently affects 200,000 to 250,000 patients in the U.S. It is the second fastest rising cancer in the U.S.,
20 rising at a rate of about 55,000 new cases per year. The incidence is rising at a rate that is greater than can be accounted for simply by the increasing age of the population and exposure to known risk factors.

The classification of lymphoma is complex, and has evolved in recent decades. In 1994 the Revised European-American Lymphoma (REAL) classification was introduced.
25 This classification organises lymphomas of B cell (the most frequently identified), T cell and unclassifiable origin into agreed subtypes. In everyday practice, the grouping of NHLs into low, intermediate and high-grade categories on the basis of their general histological appearance, broadly reflects their clinical behaviour.

NHL predominantly affects the lymph nodes but, in individual patients, the tumour
30 may involve other anatomical sites such as the liver, spleen, bone marrow, lung, gut and skin. The disease commonly presents as a painless enlargement of lymph nodes.

Extranodal lymphoma most frequently affects the gut, although primary lymphoma of virtually every organ has been documented. Systemic symptoms include fever, sweats, tiredness and weight loss.

Until recently, the Ann Arbor staging system, based entirely upon the anatomical extent of disease, was the major determinant of therapy in NHL. This information may be refined by incorporating additional prognostic pointers, including age, serum lactate dehydrogenase levels and performance status. Even so, knowledge of the Ann Arbor staging system, together with the histological and immunological subtype of the tumour, is still the major determinant of treatment.

Low grade NHL has an indolent course, with a median patient survival of 8 to 10 years. Survival is little impacted by currently available therapy, although irradiation of local disease and chemotherapy for systemic symptoms improves patients' quality of life. Combination chemotherapy may be reserved for relapsed disease. Intermediate disease and, especially, high grade disease is extremely aggressive and tends to disseminate. Disease of this grade requires urgent treatment. Radiotherapy may be a useful component of treatment in patients with very bulky disease. Many different chemotherapy regimens have been employed, and long-term disease-free survival may be obtained in more than half of patients. High dose therapy with stem cell support was introduced initially for patients with relapsed or refractory disease, but is now increasingly finding a place in first line therapy for patients with poor-risk disease. The tendency in recent years for an increasingly aggressive therapeutic approach must be balanced against the generally elderly age and relative debility of many patients with NHL, and by the need to match the toxicity of treatment to the individual prognosis of each patient's disease.

Improved treatments, that are more effective and better tolerated, are needed. Agents recently introduced include new cytotoxic drugs, progressively incorporated into combinations, and the introduction of antibody-based therapies.

Non-Hodgkin's lymphoma encompasses a range of B cell lymphomas. B cell antigens therefore represent suitable targets for antibody therapy.

CD22 is a 135 kDa membrane glycoprotein belonging to a family of sialic acid binding proteins called sialoadhesins. It is detected in the cytoplasm early in B cell development, appears on the cell surface simultaneously with IgD and is found on most mature B cells. Expression is increased following B cell activation. CD22 is lost with

terminal differentiation and is generally reported as being absent on plasma cells. Thus this internalising antigen is present on the surface of pre-B cells and mature B cells but not stem cells or plasma cells.

Two isoforms of CD22 exist in man. The predominant form (CD22 β) contains 7 immunoglobulin-like (Ig-like) domains in the extracellular region. The CD22 α variant lacks Ig-like domain 4 and may have a truncated cytoplasmic domain. Antibodies which block CD22 adhesion to monocytes, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes have been shown to bind within the first or second Ig-like domain.

The cytoplasmic domain of CD22 is tyrosine phosphorylated upon ligation of the B cell antigen receptor and associates with L γ k, Syk and phosphatidylinositol 3-kinase. The function of CD22 is to down-modulate the B cell activation threshold. It can also mediate cell adhesion through interaction with cells bearing the appropriate sialoglycoconjugates.

CD22 is expressed in most B cell leukaemias and lymphomas, including NHL, acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL), chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) and especially acute non-lymphocytic leukaemia (ANLL).

Monoclonal antibodies against CD22 have been described in the prior art. WO 98/41641 describes recombinant anti-CD22 antibodies with cysteine residues at V_H44 and V_L100. WO 96/04925 describes the V_H and V_L regions of the anti-CD22 antibody LL2. US 5686072 describes combinations of anti-CD22 and anti-CD19 immunotoxins. WO 98/42378 describes the use of naked anti-CD22 antibodies for the treatment of B-cell malignancies.

A number of antibody-based therapeutics have either been recently licensed, eg. Rituxan (an unlabelled chimeric human γ 1 (+my1V-region) specific for CD20), or are in clinical trials for this disease. These rely either on complement- or ADCC-mediated killing of B cells or the use of radionuclides, such as ¹³¹I or ⁹⁰Y, which have associated preparation and use problems for clinicians and patients. There is a need for an antibody molecule to treat NHL which can be used repeatedly and produced easily and efficiently. There is also a need for an antibody molecule, which has high affinity for CD22 and low immunogenicity in humans.

Summary of the invention

In a first aspect, the present invention provides an antibody molecule having specificity for human CD22, 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 CDR-H1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) or an H2 from which a potential glycosylation site has been removed, or an H2 in which the lysine residue at position 60 (according to the Kabat numbering system) has been replaced by an alternative amino acid, or an H2 in which both the glycosylation site and the reactive lysine at position 60 have been removed for CDR-H2 or as H3 in Figure 1 (SEQ ID NO:3) for CDR-H3.

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, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3) for the heavy chain variable domain. Preferably, the antibody molecule comprises at least two and more preferably all three CDRs in the heavy chain variable domain.

In a second aspect of the present invention, there is provided an antibody molecule having specificity for human CD22, 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 CDR-L1, L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDR-L2 or L3 in Figure 1 (SEQ ID NO:6) for CDR-L3.

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; SEQ ID NO:5 and 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 CDR-H1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) or an H2 from which a potential glycosylation site has been removed, or an H2 in which the lysine residue at position 60

(according to the Kabat numbering system) has been replaced by an alternative amino acid, or an H2 in which both the glycosylation site and the reactive lysine at position 60 have been removed for CDR-H2 or as H3 in Figure 1 (SEQ ID NO:3) for CDR-H3 and a light chain wherein the variable domain comprises a CDR (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*))
5 having the sequence given as L1 in Figure 1 (SEQ ID NO:4) for CDR-L1, as L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDR-L2 or as L3 in Figure 1 (SEQ ID NO:6) for CDR-L3.

The CDRs given in SEQ IDS NOS:1 to 6 and in Figure 1 referred to above are derived from a mouse monoclonal antibody 5/44.

The complete sequences of the variable domains of the mouse 5/44 antibody are
10 shown in Figure 2 (light chain) (SEQ ID NO:7) and Figure 3 (heavy chain) (SEQ ID NO:8). This mouse antibody is also referred to below as "the donor antibody" or the "murine monoclonal antibody".

A first alternatively preferred embodiment of the first or second aspect of the present invention is the mouse monoclonal antibody 5/44 having the light and heavy chain
15 variable domain sequences shown in Figure 2 (SEQ ID NO:7) and Figure 3 (SEQ ID NO:8), respectively. The light chain constant region of 5/44 is kappa and the heavy chain constant region is IgG1.

In a second alternatively preferred embodiment, the antibody according to either of the first and second aspects of the present invention is a chimeric mouse/human antibody
20 molecule, referred to herein as the chimeric 5/44 antibody molecule. The chimeric antibody molecule comprises the variable domains of the mouse monoclonal antibody 5/44 (SEQ ID NOS:7 and 8) and human constant domains. Preferably, the chimeric 5/44 antibody molecule comprises the human C kappa domain (Hieter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; Genebank accession number J00241) in the light chain and the human gamma 4
25 domains (Flanagan *et al.*, Nature, 300, 709-713, 1982) in the heavy chain, optionally with the serine residue at position 241 replaced by a proline residue.

Preferably, the antibody of the present invention comprises a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) an H2' in which a potential glycosylation site sequence has been removed and which unexpectedly
30 increased the affinity of the chimeric 5/44 antibody for the CD22 antigen and which preferably has as CDR-H2 the sequence given as H2' (SEQ ID NO:13).

Alternatively or additionally, the antibody of the present invention may comprise a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat et al., (*supra*)) an H2'' in which a lysine residue at position 60, which is located at an exposed position within CDR-H2 and which is considered to have the potential to react with conjugation agents resulting in a reduction of antigen binding affinity, is substituted for an alternative amino acid to result in a conserved substitution. Preferably CDR-H2 has the sequence given as H2'' (SEQ ID NO:15).

Alternatively or additionally, the antibody of the present invention may comprise a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat et al., (*supra*)) an H2''' in which both the potential glycosylation site sequence and the lysine residue at position 60, are substituted for alternative amino acids. Preferably CDR-H2 has the sequence given as H2''' (SEQ ID NO:16).

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

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

When the CDRs are grafted, any appropriate acceptor variable region framework sequence may be used having regard to the class/type of the donor antibody from which the CDRs are derived, including mouse, primate and human framework regions. Examples of human frameworks which can be used in the present invention are KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEL, LAY and POM (Kabat *et al.* (*supra*)). For example, KOL and NEWM can be used for the heavy chain, REI can be used for the light chain and EU, LAY and POM can be used for both the heavy chain and the light chain. Alternatively, human germline sequences may be used. The preferred framework region for the light chain is the human germline sub-group sequence (DPK9+JK1) shown in Figure 5 (SEQ ID NO:17). The preferred framework region for the heavy chain is the human sub-group sequence (DP7+JH4) shown in Figure 6 (SEQ ID NO:21).

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 or to a residue that is a conservative substitution for 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 according to the present invention, if the acceptor light chain has the human sub-group DPK9+JK1 sequence (shown in Figure 2) (SEQ ID NO:17) then the acceptor framework regions of the light chain comprise donor residues at positions 2, 4, 37, 38, 45 and 60 and may additionally comprise a donor residue at position 3 (according to Kabat *et al.* (*supra*)).

Preferably, in a CDR-grafted antibody molecule of the present invention, if the acceptor heavy chain has the human DP7+JH4 sequence (shown in Figure 3) (SEQ ID NO:21), then the acceptor framework regions of the heavy chain comprise, in addition to one or more donor CDRs, donor residues at positions 1, 28, 48, 71 and 93 and may additionally comprise donor residues at positions 67 and 69 (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.

Preferably, the antibody of the present invention comprises a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat *et al.*, (*supra*)) an H2' in which a potential glycosylation site sequence has been removed in order to increase the

affinity of the chimeric 5/44 antibody for the CD22 antigen and which preferably has as CDR-H2 the sequence given as H2' (SEQ ID NO:13).

Alternatively or additionally, the antibody of the present invention may comprise a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat et al., (supra)) an H2'' in which a lysine residue at position 60, which is located at an exposed position within CDR-H2 and which is considered to have the potential to react with conjugation agents resulting in a reduction of antigen binding affinity, is substituted for an alternative amino acid. Preferably CDR-H2 has the sequence given as H2'' (SEQ ID NO:15).

Alternatively or additionally, the antibody of the present invention may comprise a heavy chain wherein the variable domain comprises as CDR-H2 (as defined by Kabat et al., (supra)) an H2''' in which both the potential glycosylation site sequence and the lysine residue at position 60, are substituted for alternative amino acids. Preferably CDR-H2 has the sequence given as H2''' (SEQ ID NO:16).

The antibody molecule of the present invention may comprise: a complete antibody molecule, having full length heavy and light chains; a fragment thereof, such as a Fab, modified Fab, Fab', F(ab')₂ or Fv fragment; a light chain or heavy chain monomer or dimer; a single chain antibody, e.g. a single chain Fv in which the heavy and light chain variable domains are joined by a peptide linker. Similarly, the heavy and light chain variable regions may be combined with other antibody domains as appropriate.

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

The antibody molecule of the present invention preferably has a binding affinity of at least 0.85×10^{-10} M, more preferably at least 0.75×10^{-10} M and most preferably at least 0.5×10^{-10} M.

Preferably, the antibody molecule of the present invention comprises the light chain variable domain 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) and the heavy chain variable domain 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27). The sequences of the variable domains of these light and heavy chains are shown in Figures 5 and 6, respectively.

5 The present invention also relates to variants of the antibody molecule of the present invention, which have an improved affinity for CD22. Such variants can be obtained by a number of affinity maturation protocols including mutating the CDRs (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), chain shuffling (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), use of mutator strains of *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-
10 368, 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 (Cramer *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
15 light chain(s) of the antibody molecule of the present invention.

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

The DNA sequence of the present invention may comprise synthetic DNA, for instance produced by chemical processing, cDNA, genomic DNA or any combination
20 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.

25 General methods by which the vectors may be constructed, transfection methods and culture methods are well known to those skilled in the art. In this respect, reference is made to "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

30 DNA sequences which encode the antibody molecule of the present invention can be obtained by methods well known to those skilled in the art. For example, DNA

sequences coding for part or all of the antibody heavy and light chains may be synthesised as desired from the determined DNA sequences or on the basis of the corresponding amino acid sequences.

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

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

Any suitable host cell/vector system may be used for expression of the DNA sequences encoding the antibody molecule of the present invention. Bacterial, for example *E. coli*, and other microbial systems may be used, in part, for expression of antibody fragments such as Fab and F(ab')₂ fragments, and especially Fv fragments and single chain
15 antibody fragments, for example, single chain Fvs. Eukaryotic, e.g. mammalian, host cell expression systems may be used for production of larger antibody molecules, including complete antibody molecules. Suitable mammalian host cells include CHO, myeloma or hybridoma cells.

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

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

21

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

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

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

The pharmaceutical compositions 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
15 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.

20 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
25 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
30 depends on the nature of the condition to be treated, the grade of the malignant lymphoma

or leukaemia and on whether the antibody molecule is being used prophylactically or to treat an existing condition.

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
5 may be necessary to give one or more doses per day. Alternatively, if the antibody molecule has a long half life (e.g. 2 to 15 days) it may only be necessary to give a dosage once per day, once 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

23

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
5 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
10 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
15 interstitial space of a tissue. The compositions can also be administered into a lesion. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule.

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

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

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

30 The present invention also provides the antibody molecule of the present invention for use in treating a disease mediated by cells expressing CD22.

24

The present invention further provides the use of the antibody molecule according to the present invention in the manufacture of a medicament for the treatment of a disease mediated by cells expressing CD22.

The antibody molecule of the present invention may be utilised in any therapy
5 where it is desired to reduce the level of cells expressing CD22 that are present in the human or animal body. These CD22-expressing cells may be circulating in the body or be present in an undesirably high level localised at a particular site in the body. For example, elevated levels of cells expressing CD22 will be present in B cell lymphomas and leukaemias. The antibody molecule of the present invention may be utilised in the therapy
10 of diseases mediated by cells expressing CD22.

The antibody molecule of the present invention is preferably used for treatment of malignant lymphomas and leukaemias, most preferably NHL.

The present invention also provides a method of treating human or animal subjects suffering from or at risk of a disorder mediated by cells expressing CD22, the method
15 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 cells that express CD22.

20 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 amino acid sequence of the CDRs of mouse monoclonal antibody 5/44 (SEQ ID NOS:1 to 6);

Figure 2 shows the complete sequence of the light chain variable domain of mouse
25 monoclonal antibody 5/44;

Figure 3 shows the complete sequence of the heavy chain variable domain of mouse monoclonal antibody 5/44;

Figure 4 shows the strategy for removal of the glycosylation site and reactive lysine in CDR-H2;

30 Figure 5 shows the graft design for the 5/44 light chain sequence;

Figure 6 shows the graft design for the 5/44 heavy chain sequence;

Figure 7 shows the vectors pMRR14 and pMRR10.1;

Figure 8 shows the Biacore assay results of the chimeric 5/44 mutants;

Figure 9 shows the oligonucleotides for 5/44 gH1 and gL1 gene assemblies;

5 Figure 10 shows the intermediate vectors pCR2.1(544gH1) and pCR2.1(544gL1);

Figure 11 shows the oligonucleotide cassettes used to make further grafts;

Figure 12 shows the competition assay between fluorescently labelled mouse 5/44 antibody and grafted variants; and

10 Figure 13 shows the full DNA and protein sequence of the grafted heavy and light chains.

Detailed description of the invention

Example 1: Generation of Candidate Antibodies

15

A panel of antibodies against CD22 were selected from hybridomas using the following selection criteria: binding to Daudi cells, internalisation on Daudi cells, binding to peripheral blood mononuclear cells (PBMC), internalisation on PBMC, affinity (greater than 10^{-9} M), mouse $\gamma 1$ and production rate. 5/44 was selected as the preferred antibody.

20

Example 2: Gene Cloning and Expression of a Chimeric 5/44 Antibody Molecule

Preparation of 5/44 Hybridoma Cells and RNA Preparation therefrom

25 Hybridoma 5/44 was generated by conventional hybridoma technology following immunisation of mice with human CD22 protein. RNA was prepared from 5/44 hybridoma cells using a RNEasy kit (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue No. 74106). The RNA obtained was reverse transcribed to cDNA, as described below.

26

Distribution of CD22 on NHL tumours

An immunohistochemistry study was undertaken to examine the incidence and distribution of staining using the 5/44 anti-CD22 monoclonal antibodies. Control anti-CD20 and anti-CD79a antibodies were included in the study to confirm B cell areas of tumours.

A total of 50 tumours were studied and these were categorised as follows by using the Working Formulation and REAL classification systems:

- 10 • 7 B lymphoblastic leukaemia/lymphoma (High/I)
- 4 B-CLL/small lymphocytic lymphoma (Low/A)
- 3 lymphoplasmacytoid/Immunocytoma (Low/A)
- 1 Mantle cell (Int/F)
- 14 Follicle center lymphoma (Low to Int/D)
- 15 • 13 Diffuse large cell lymphoma (Int to High/G,H)
- 6 Unclassifiable (K)
- 2 T cell lymphomas

40 B cell lymphomas were positive for CD22 antigen with the 5/44 antibody at 0.1 µg/ml and a further 6 became positive when the concentration was increased to 0.5 µg/ml. For the remaining 2 B cell tumours that were negative at 0.1 µg/ml, there was insufficient tissue remaining to test at the higher concentration. However, parallel testing with another Celltech anti-CD22 antibody 6/13, which gave stronger staining than 5/44, resulted in all 48 B cell lymphomas staining positive for CD22.

25 Thus, it is possible to conclude that the CD22 antigen is widely expressed on B cell lymphomas and thus provides a suitable target for immunotherapy in NHL.

PCR Cloning of 5/44 V_H and V_L

cDNA sequences coding for the variable domains of 5/44 heavy and light chains were synthesised using reverse transcriptase to produce single stranded cDNA copies of the mRNA present in the total RNA. This was then used as the template for amplification of the murine V-region sequences using specific oligonucleotide primers by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

a) cDNA Synthesis

cDNA was synthesised in a 20 µl reaction volume containing the following reagents: 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 20 units RNasin, 75 ng random hexanucleotide primer, 2 µg 5/44 RNA and 200 units Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 60 minutes, the reaction was terminated by heating at 95°C for 5 minutes.

b) PCR

Aliquots of the cDNA were subjected to PCR using combinations of primers specific for the heavy and light chains. Degenerate primer pools designed to anneal with the conserved sequences of the signal peptide were used as forward primers. These sequences all contain, in order, a restriction site (V_L SfaI; V_H HindIII) starting 7 nucleotides from their 5' ends, the sequence GCCGCCACC (SEQ ID NO:50), to allow optimal translation of the resulting mRNAs, an initiation codon and 20-30 nucleotides based on the leader peptide sequences of known mouse antibodies (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

The 3' primers are designed to span the framework 4 J-C junction of the antibody and contain a restriction site for the enzyme BstWI to facilitate cloning of the V_L PCR fragment. The heavy chain 3' primers are a mixture designed to span the J-C junction of the antibody. The 3' primer includes an ApaI restriction site to facilitate cloning. The 3' region of the primers contains a mixed sequence based on those found in known mouse antibodies (Kabat *et al.*, 1991, *supra*).

The combinations of primers described above enable the PCR products for V_H and V_L to be cloned directly into an appropriate expression vector (see below) to produce

chimeric (mouse-human) heavy and light chains and for these genes to be expressed in mammalian cells to produce chimeric antibodies of the desired isotype.

Incubations (100 μ l) for the PCR were set up as follows. Each reaction contained 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% w/v gelatin, 0.25 mM each
 5 deoxyribonucleoside triphosphate, 10 pmoles 5' primer mix, 10 pmoles 3' primer, 1 μ l cDNA and 1 unit Taq polymerase. Reactions were incubated at 95°C for 5 minutes and then cycled through 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. After 30 cycles, aliquots of each reaction were analysed by electrophoresis on an agarose gel.

For the heavy chain V-region, an amplified DNA product was only obtained when
 10 a primer pool annealing within the start of framework I replaced the signal peptide primer pool. The fragments were cloned into DNA sequencing vectors. The DNA sequence was determined and translated to give a deduced amino acid sequence. This deduced sequence was verified by reference to the N-terminal protein sequence determined experimentally. Figures 2 and 3 shows the DNA/protein sequence of the mature light and heavy chain V-
 15 regions of mouse monoclonal 5/44 respectively.

c) Molecular Cloning of the PCR Fragments

The murine v-region sequences were then cloned into the expression vectors pMRR10.1 and pMRR14 (Figure 7). These are vectors for the expression of light and heavy chain respectively containing DNA encoding constant regions of human kappa light
 20 chain and human gamma-4 heavy chain. The V_L region was sub-cloned into the expression vector by restriction digest and ligation from the sequencing vector, using SfuI and BsiWI restriction sites, creating plasmid pMRR10(544cL). The heavy chain DNA was amplified by PCR using a 5' primer to introduce a signal peptide, since this was not obtained in the cloning strategy -- a mouse heavy chain antibody leader from a different in-
 25 house hybridoma (termed 162) was employed. The 5' primer had the following sequence:
 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCTGGC
 ACTCATTCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG3' (SEQ
 ID NO:51).

The reverse primer was identical to that used in the original V_H gene cloning. The
 30 resultant PCR product was digested with enzymes HindIII and ApaI, was sub-cloned, and its DNA sequence was confirmed, creating plasmid pMRR14(544cH). Transient co-

transfection of both expression vectors into CHO cells generated chimeric c5/44 antibody. This was achieved using the Lipofectamine reagent according to the manufacturer's protocols (Invitrogen:Life Technology, Groningen, The Netherlands. Catalogue no. 11668-027).

5

Removal of Glycosylation Site and Reactive Lysine

A potential N-linked glycosylation site sequence was observed in CDR-H2, having the amino acid sequence N-Y-T (Figure 3). SDS-PAGE, Western blotting and carbohydrate staining of gels of 5/44 and its fragments (including Fab) indicated that this site was indeed glycosylated (not shown). In addition, a lysine residue was observed at an exposed position within CDR-H2, which had the potential to reduce the binding affinity of the antibody by providing an additional site for conjugation with an agent with which the antibody may be conjugated.

A PCR strategy was used to introduce amino acid substitutions into the CDR-H2 sequence in an attempt to remove the glycosylation site and/or the reactive lysine, as shown in Figure 4. Forward primers encoding the mutations N55Q, T57A or T57V were used to remove the glycosylation site (Figure 4) and a fourth forward primer containing the substitution K60R, was generated to remove the reactive lysine residue (Figure 4). A framework 4 reverse primer was used in each of these PCR amplifications. The PCR products were digested with the enzymes XbaI and ApaI and were inserted into pMRR14(544cH) (also cleaved with XbaI and ApaI) to generate expression plasmids encoding these mutants. The N55Q, T57A and T57V mutations ablate the glycosylation site by changing the amino acid sequence away from the consensus N-X-T/S whilst the K60R mutation replaces the potentially reactive lysine with the similarly positively charged residue arginine. The resultant cH variant plasmids were co-transfected with the cL plasmid to generate expressed chimeric antibody variants.

Evaluation of Activities of Chimeric Genes

The activities of the chimeric genes were evaluated following transient transfection into CHO cells.

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

30

The affinities of chimeric 5/44 or its variants, which have had their glycosylation site or their reactive lysine removed, were investigated using BIA technology for binding to CD22-mFc constructs. The results are shown in Figure 8. All binding measurements were performed in the BIAcore™ 2000 instrument (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). The assay was performed by capture of CD22mFc via the immobilised anti-mouse Fc. The antibody was in the soluble phase. Samples, standard, and controls (50ul) were injected over immobilised anti-mouse Fc followed by antibody in the soluble phase. After each cycle the surface was regenerated with 50ul of 40mM HCl at 30ul/min. The kinetic analysis was performed using the BIAevaluation 3.1 software (Pharmacia).

10 Removal of the glycosylation site in construct T57A resulted in a slightly faster on-rate and a significantly slower off-rate, compared to the chimeric 5/44, giving an affinity improvement of approximately 5-fold. The N55Q mutation had no effect on affinity. This result was unexpected as it suggests that the removal of the carbohydrate itself apparently has no effect on binding (as with the N55Q change). The improved affinity was observed
15 only with the T57A change. One possible explanation is that, regardless of the presence of carbohydrate, the threonine at position 57 exerts a negative effect on binding that is removed on conversion of threonine to alanine. The hypothesis that the small size of alanine is important, and that the negative effect of threonine is related to its size, is supported from the result obtained using the T57V mutation: that replacement with valine
20 at position 57 is not beneficial (results not shown).

Removal of the lysine by the K60R mutation had a neutral effect on affinity, i.e. the introduction of arginine removes a potential reactive site without compromising affinity.

The mutations for removal of the glycosylation site and for removal of the reactive lysine were therefore both included in the humanisation design.

25

Example 2: CDR-Grafting of 5/44

The molecular cloning of genes for the variable regions of the heavy and light chains of the 5/44 antibody and their use to produce chimeric (mouse/human) 5/44
30 antibodies has been described above. The nucleotide and amino acid sequences of the mouse 5/44 V_L and V_H domains are shown in Figures 2 and 3 (SEQ ID NOS:7 and 8),

respectively. This example describes the CDR-grafting of the 5/44 antibody onto human frameworks to reduce potential immunogenicity in humans, according to the method of Adair et al., (WO91/09967).

5 CDR-Grafting of 5/44 Light Chain

Protein sequence alignment with consensus sequences from human sub-group I kappa light chain V region indicated 64% sequence identity. Consequently, for constructing the CDR-grafted light chain, the acceptor framework regions chosen corresponded to those of the human VK sub-group I germline O12,DPK9 sequence. The
10 framework 4 acceptor sequence was derived from the human J-region germline sequence JK1.

A comparison of the amino acid sequences of the framework regions of murine 5/44 and the acceptor sequence is given in Figure 5 and shows that there are 27 differences between the donor and acceptor chains. At each position, an analysis was made of the
15 potential of the murine residue to contribute to antigen binding, either directly or indirectly, through effects on packing or at the V_H/V_L interface. If a murine residue was considered important and sufficiently different from the human residue in terms of size, polarity or charge, then that murine residue was retained. Based on this analysis, two
20 versions of the CDR-grafted light chain, having the sequences given in SEQ ID NO:19 and SEQ ID NO:20 (Figure 5), were constructed.

CDR-Grafting of 5/44 Heavy Chain

CDR-grafting of 5/44 heavy chain was accomplished using the same strategy as described for the light chain. The V-domain of 5/44 heavy chain was found to be
25 homologous to human heavy chains belonging to sub-group I (70% sequence identity) and therefore the sequence of the human sub-group I germline framework VH1-3,DP7 was used as an acceptor framework. The framework 4 acceptor sequences were derived from human J-region germline sequence JH4.

A comparison of 5/44 heavy chain with the framework regions is shown in Figure 6
30 where it can be seen that the 5/44 heavy chain differs from the acceptor sequence at 22 positions. Analysis of the contribution that any of these might make to antigen binding led

32

to 5 versions of the CDR-grafted heavy chains being constructed, having the sequences given in SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27 (Figure 6).

5 Construction of genes for grafted sequences.

Genes were designed to encode the grafted sequences gH1 and gL1, and a series of overlapping oligonucleotides were designed and constructed (Figure 9). A PCR assembly technique was employed to construct the CDR-grafted V-region genes. Reaction volumes of 100 μ l were set up containing 10 mM Tris-HCl pH8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.001 % gelatin, 0.25 mM each deoxyribonucleoside triphosphate, 1 pmole each of the 'internal' primers (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 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 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 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 (544gH1) and pCR2.1(544gL1) (Figure 10).

An oligonucleotide cassette replacement method was used to create the humanised grafts gH4,5,6 and 7, and gL2. Figure 11 shows the design of the oligonucleotide cassettes. To construct each variant, the vector (pCR2.1(544gH1) or pCR2.1(544gL1)) was cut with the restriction enzymes shown (XmaI/SacII for the heavy chain, XmaI/BstEII for the light chain). The large vector fragment was gel purified from agarose and was used in ligation with the oligonucleotide cassette. These cassettes are composed of 2 complementary oligonucleotides (shown in Figure 11), mixed at a concentration of 0.5 pmol/ μ l in a volume of 200 μ l 12.5 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 0.25 mM dithioerythritol. Annealing was achieved by heating to 95 °C for 3 minutes in a waterbath (volume 500 ml) then allowing the reaction to slow-cool to room temperature. The annealed oligonucleotide cassette was then 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 (5/44-gH4-7) and pCR2.1(5/44-gL2). The verified grafted sequences were then sub-cloned into the expression vectors pMRR14 (heavy chain) and pMR10.1 (light chain).

5

CD22 binding activity of CDR-grafted sequences

The vectors encoding grafted variants were co-transfected into CHO cells in a variety of combinations, together with the original chimeric antibody chains. Binding activity was compared in a competition assay, competing the binding of the original mouse 5/44 antibody for binding to Ramos cells (obtained from ATCC, a Burkitt's lymphoma lymphoblast human cell line expressing surface CD22). This assay was considered the best way to compare grafts in their ability to bind to cell surface CD22. The results are shown in Figure 8. As can be seen, there is very little difference between any of the grafts, all performing more effectively than the chimeric at competing against the murine parent.

15 The introduction of the 3 additional human residues at the end of CDR-H3 (gH5 and gH7) does not appear to have affected binding.

The graft combination with the least number of murine residues was selected, gL1gH7. The light chain graft gL1 has 6 donor residues. Residues V2, V4, L37 and Q45 are potentially important packing residues. Residue H38 is at the V_H/V_L interface.

20 Residue D60 is a surface residue close to the CDR-L2 and may directly contribute to antigen binding. Of these residues, V2, L37, Q45 and D60 are found in germline sequences of human kappa genes from other sub-groups. The heavy chain graft gH7 has 4 donor framework residues (Residue R28 is considered to be part of CDR-H1 under the structural definition used in CDR-grafting (see Adair et al (1991 WO91/09967)). Residues

25 E1 and A71 are surface residues close to the CDR's. Residue I48 is a potential packing residue. Residue T93 is present at the V_H/V_L interface. Of these residues, E1 and A71 are found in other germline genes of human sub-group 1. Residue I48 is found in human germline sub-group 4, and T73 is found in human germline sub-group 3.

The full DNA and protein sequence of both the light chain and heavy chain, including approximate position of introns within the constant region genes provided by the

30 vectors, are shown in Figure 13 and are given in SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:28

respectively for the light chain and SEQ ID NO: 31 and SEQ ID NO:30 respectively for the heavy chain.

DNA encoding these light and heavy chain genes was excised from these vectors. Heavy chain DNA was digested at the 5' HindIII site, then was treated with the Klenow
5 fragment of *E. coli* DNA polymerase I to create a 5' blunt end. Cleavage at the 3' EcoRI site resulted in the heavy chain fragment which was purified from agarose gels. In the same way, a light chain fragment was produced, blunted at the 5' SfuI site and with a 3' EcoRI site. Both fragments were cloned into DHFR based expression vectors and used to generate stable cell lines in CHO cells.

CLAIMS

1. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR having at least one of the sequences given as H1 in Figure 1 (SEQ ID NO:1) for CDR-H1, as H2 in Figure 1 (SEQ ID NO:2) or H2' (SEQ ID NO:13) or H2'' (SEQ ID NO:15) or H2''' (SEQ ID NO:16) for CDR-H2 or as H3 in Figure 1 (SEQ ID NO:3) for CDR-H3.
2. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a light chain wherein the variable domain comprises a CDR having at least one of the sequences given as L1 in Figure 1 (SEQ ID NO:4) for CDR-L1, as L2 in Figure 1 (SEQ ID NO:5) for CDR-L2 or as L3 in Figure 1 (SEQ ID NO:6) for CDR-L3.
3. The antibody molecule of claim 1 or claim 2 comprising a heavy chain wherein the variable domain comprises a CDR having at least one of the sequences given in SEQ ID NO:1 for CDR-H1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:15 or SEQ ID NO:16 for CDR-H2 or SEQ ID NO:3 for CDR-H3 and a light chain wherein the variable domain comprises a CDR having at least one of the sequences given in SEQ ID NO:4 for CDR-L1, SEQ ID NO:5 for CDR-L2 or SEQ ID NO:6 for CDR-L3.
4. The antibody molecule of claim 3, which comprises SEQ ID NO:1 for CDR-H1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:15 or SEQ ID NO:16 for CDR-H2, SEQ ID NO:3 for CDR-H3, SEQ ID NO:4 for CDR-L1, SEQ ID NO:5 for CDR-L2 and SEQ ID NO:6 for CDR-L3.
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 sub-group I consensus

sequence and comprise donor residues at positions 1, 28, 48, 71 and 93 that correspond to the residues at those positions in SEQ ID NO:8.

8. The antibody molecule of claim 7, additionally comprising donor residues at positions 67 and 69 that correspond to the residues at those positions in SEQ ID NO:8.

9. The antibody molecule of any one of claims 6 to 8, wherein the human acceptor framework regions of the variable domain of the light chain are based on a human subgroup I consensus sequence and comprise donor residues at positions 2, 4, 37, 38, 45 and 60 that correspond to the residues at those positions in SEQ ID NO:7.

10. The antibody molecule of claim 9, additionally comprising a donor residue at position 3 that corresponds to the residue at that position in SEQ ID NO:7.

11. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a heavy chain according to either claim 7 or claim 8, and a light chain according to either claim 9 or claim 10.

12. The antibody molecule of any one of claims 1 to 11, comprising the light chain variable region 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) and the heavy chain variable region 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

13. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a light chain, wherein the sequence of the light chain comprises the sequence given in SEQ ID NO:28.

14. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a light chain, wherein the sequence of the light chain consists of the sequence given in SEQ ID NO:28.

15. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a heavy chain, wherein the sequence of the heavy chain comprises the sequence given in SEQ ID NO:30.

- 37
16. An antibody molecule having specificity for human CD22, comprising a heavy chain, wherein the sequence of the heavy chain consists of the sequence given in SEQ ID NO:30.
- 5
17. An antibody molecule having specificity for human CD22, having a light chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:28 and a heavy chain comprising the sequence given in SEQ ID NO:30.
- 10 18. An antibody molecule having specificity for human CD22, having a light chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:28 and a heavy chain consisting of the sequence given in SEQ ID NO:30.
- 15 19. A variant of the antibody molecule of any one of claims 1 to 18, which has an improved affinity for CD22.
20. The variant of claim 19 which is obtained by an affinity maturation protocol.
21. The antibody of any one of claims 1 to 4, which is murine anti-CD22 monoclonal antibody 5/44, wherein the variable domain of the light chain has the sequence given in SEQ ID NO: 7 and the variable domain of the heavy chain has the sequence given in SEQ ID NO: 8.
- 25 22. The antibody molecule of any one of claims 1 to 4, which is a chimeric antibody molecule comprising the sequences of the light and heavy chain variable domains of the monoclonal antibody of claim 21, recited in SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:8 respectively.
- 30 23. An antibody molecule comprising a hybrid CDR comprising a truncated donor CDR sequence wherein the missing portion of the donor CDR is replaced by a different sequence and forms a functional CDR.

24. The antibody molecule of claim 23, wherein the missing part of the CDR sequence is from the antibody from which the framework regions of the antibody molecule are derived.
- 5 25. The antibody molecule of claim 24, wherein the missing part of the CDR sequence is derived from a germline antibody having consensus framework regions.
26. The antibody molecule of any one of claims 23 to 25, wherein CDR-H2 of the heavy chain is hybrid in the antibody molecule.
- 10 27. The antibody molecule of any one of claims 23 to 26, wherein the truncation of the donor CDR is from 1 to 8 amino acids.
28. The antibody molecule of claim 27, wherein the truncation is from 4 to 6 amino
15 acids.
29. The antibody molecule of any one of claims 23 to 28, wherein the truncation is made at the C-terminus of the CDR.
- 20 30. A DNA sequence encoding the heavy chain and/or the light chain of an antibody molecule according to any one of claims 1 to 29.
31. A cloning or expression vector comprising a DNA sequence according to claim 30.
- 25 32. A host cell comprising a cloning or expression vector according to claim 31.
33. An antibody molecule according to any one of claims 1 to 29 or a DNA sequence according to claim 30 for use in therapy.
- 30 34. The antibody molecule of any one of claims 1 to 29 or 33, having specificity for human CD22, or a DNA sequence according to claim 30 for use in treating a pathology mediated by cells expressing CD22.

35. An antibody molecule according to claim 33 or claim 34 or a DNA sequence according to claim 33 or claim 34, for use in treating malignant lymphoma.
36. The antibody molecule or DNA sequence of claim 35, wherein the malignant lymphoma is Non-Hodgkin's lymphoma.
37. Use of the antibody molecule of any one of claims 1 to 29, having specificity for human CD22, or use of a DNA sequence according to claim 30 in the manufacture of a medicament for the treatment of a pathology mediated by cells expressing CD22.
38. The use of claim 37, wherein the pathology is malignant lymphoma.
39. Claim 38, wherein the malignant lymphoma is Non-Hodgkin's lymphoma.
40. A therapeutic or diagnostic composition comprising the antibody molecule of any one of claims 1 to 29 or the DNA sequence of claim 30.
41. A therapeutic or diagnostic composition according to claim 40, comprising a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.
42. A therapeutic or diagnostic composition according to claim 40 or claim 41, additionally comprising anti-T cell, anti-IFN γ or anti-LPS antibodies, or non-antibody ingredients such as xanthines.
43. A process for the production of an antibody molecule according to any one of claims 1 to 29 comprising culturing a host cell according to claim 32 under conditions suitable for leading to expression of protein from DNA encoding said antibody molecule and isolating said antibody molecule.
44. A process for the preparation of a therapeutic or diagnostic composition according to any one of claims 40 to 42, comprising admixing an antibody molecule

40

according to any one of claims 1 to 29 together with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

45. A polypeptide having the amino acid sequence given in any one of SEQ ID NOs:1
5 to 28 or SEQ ID NO:30.

Figure 1: Sequence of CDRs of mouse monoclonal 5/44

H1	NYWIIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

Figure 2: DNA/Protein sequence of 5/44 V_L

10 20 30 40 50
 GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC ASC TTT GGA GAT CAA GTT
 CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA
 D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>

60 70 80 90 100 110
 TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG
 AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC
 S I S C R S S Q S L A M S Y G N T F L>

120 130 140 150 160 170
 TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC
 AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG
 S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>

180 190 200 210 220
 AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AAG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
 TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG
 N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>

230 240 250 260 270 280
 ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA
 TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT
 T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>

290 300 310 320 330
 GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT
 CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA
 G T H Q P Y T F G G G T K L E I K R>

Figure 3: DNA/Protein sequence of 5/44 V_H

10 20 30 40 50
 GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG OCT GGG GCT TCC GTG AAG
 CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC
 E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>

60 70 80 90 100 110
 ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA
 TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT
 M S C K A S G Y R P T N Y W I H W V K>

120 130 140 150 160 170
 CAG AGG OCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT
 GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA OCT TTA TTA ATA
 Q R P G Q G L E W I G G I H P G M N Y>

180 190 200 210 220
 ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC
 TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CCG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CCG
 T T Y K R N L K G K A T L T A V T S A>

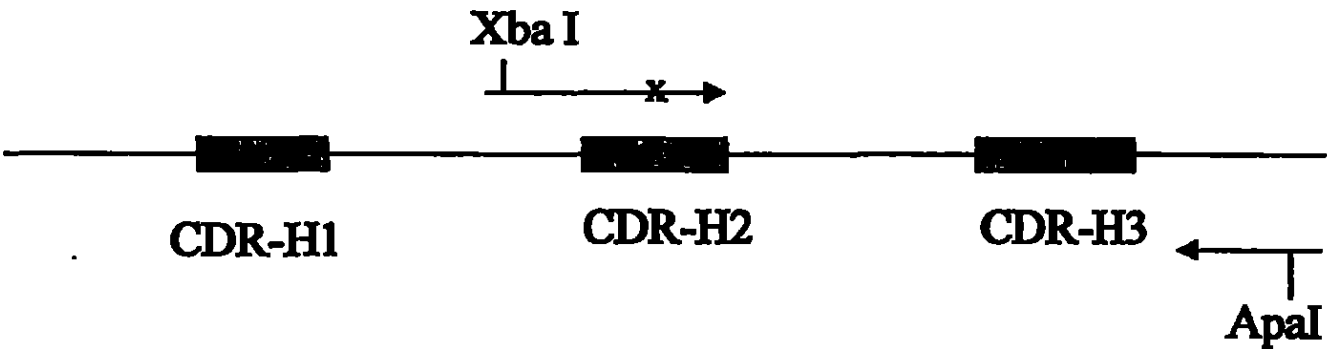
230 240 250 260 270 280
 AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC
 TCG TGA CCG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CCG CAG ATA ATG
 S T A Y N D L S S L T S E D S A V Y Y>

290 300 310 320 330 340
 TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GGC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG
 ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CCG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC
 C T R E G Y G N Y G A W F A Y W S Q G>

350 360
 ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
 T L V T V S S>

Figure 4: Removal of Glycosylation Site and Reactive Lysine

PCR strategy to mutate CDR-H2 in cH vector



CDR-H2

		556065
cH		GNNYTTYKRNLKG
N55Q	H2''	GNQYTTYKRNLKG
T57A	H2'	GNNYATYKRNLKG
T57V		GNNYVTYKRNLKG

Figure 5: 5/44 Light Chain Sequence Graft design

	10	20	40	
V _L	DVVVTQTPLSLPVSEFGDQVSISC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGQSPQLLIY	
DPK9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC		WYQOKPGKAPKLLIY	
g _{L1}	DVQVTQSPSSLSASVGDRVITTC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
g _{L2}	DVVVTQSPSSLSASVGDRVITTC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
	60	70	80	90
V _L	GISNRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYC	LQGT	HQPYT
DPK9	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC			
g _{L1}	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGT	HQPYT
g _{L2}	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGT	HQPYT
	100			
V _L	FGGGTKLEIKR			
JK1	FGQGTKVEIKR			
g _{L1}	FGQGTKVEIKR			
g _{L2}	FGQGTKVEIKR			

DPK-9 is the human germ-line acceptor framework sequence.

Vertical lines indicate differences between mouse and human residues.

Sequences underlined indicate donor residues which have been retained in the graft.

CDRs are indicated in blue (not shown for DPK-9).

Graft g_{L1} has 6 donor framework residues, g_{L2} has 7.

46

Figure 6: 5/44 Heavy Chain Sequence Graft design

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGT	VLARPGASVK	MSCKASGYRFT	NYWIH WVRQ	RPQGGLIEWIG GINP
DP7	QVQLVQSGAEV	KKPGASVKV	SCKASGYTFT	WVRQAPGQGL	EWIG
gH1	<u>EVQLVQSGAEV</u>	<u>KKPGASVKV</u>	<u>SCKASGYRFT</u>	<u>NYWIH WVRQ</u>	<u>APGQGLIEWIG</u> GINP
gH4,5,6,7	<u>EVQLVQSGAEV</u>	<u>KKPGASVKV</u>	<u>SCKASGYRFT</u>	<u>NYWIH WVRQ</u>	<u>APGQGLIEWIG</u> GINP
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDL	SSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG	
DP7	KFQG	RVIMTRDTSTSTVY	MELSSLRSEDTAVYYCAR		
gH1	GNNYTTYKRNLKG	<u>RATLTADTSTSTVY</u>	<u>MELSSLRSEDTAVYYCTR</u>	EGYGNYG	
gH4	GNNYATYRRNLKG	<u>RATLTADTSTSTVY</u>	<u>MELSSLRSEDTAVYYCTR</u>	EGYGNYG	
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVIMTADTSTSTVY	MELSSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH6	GNNYATYRRKFQG	<u>RATLTADTSTSTVY</u>	<u>MELSSLRSEDTAVYYCTR</u>	EGYGNYG	
gH7	GNNYATYRRKFQG	RVIMTADTSTSTVY	MELSSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
	110				
JH4	WGQGT	LVTVSS			
V _H	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH1	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH4,5,6,7	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		

DP7 is the human germ-line acceptor framework sequence.

Vertical lines indicate differences between mouse and human residues.

Sequences underlined indicate donor residues which have been retained in the graft.

CDRs are indicated in blue (not shown for DP7)

Grafts gH4 and gH6 have 6 donor framework residues. Grafts gH5 and gH7 have 4.

47

7/19
Maps of pMRR14 and pMRR10.1

Figure 7:

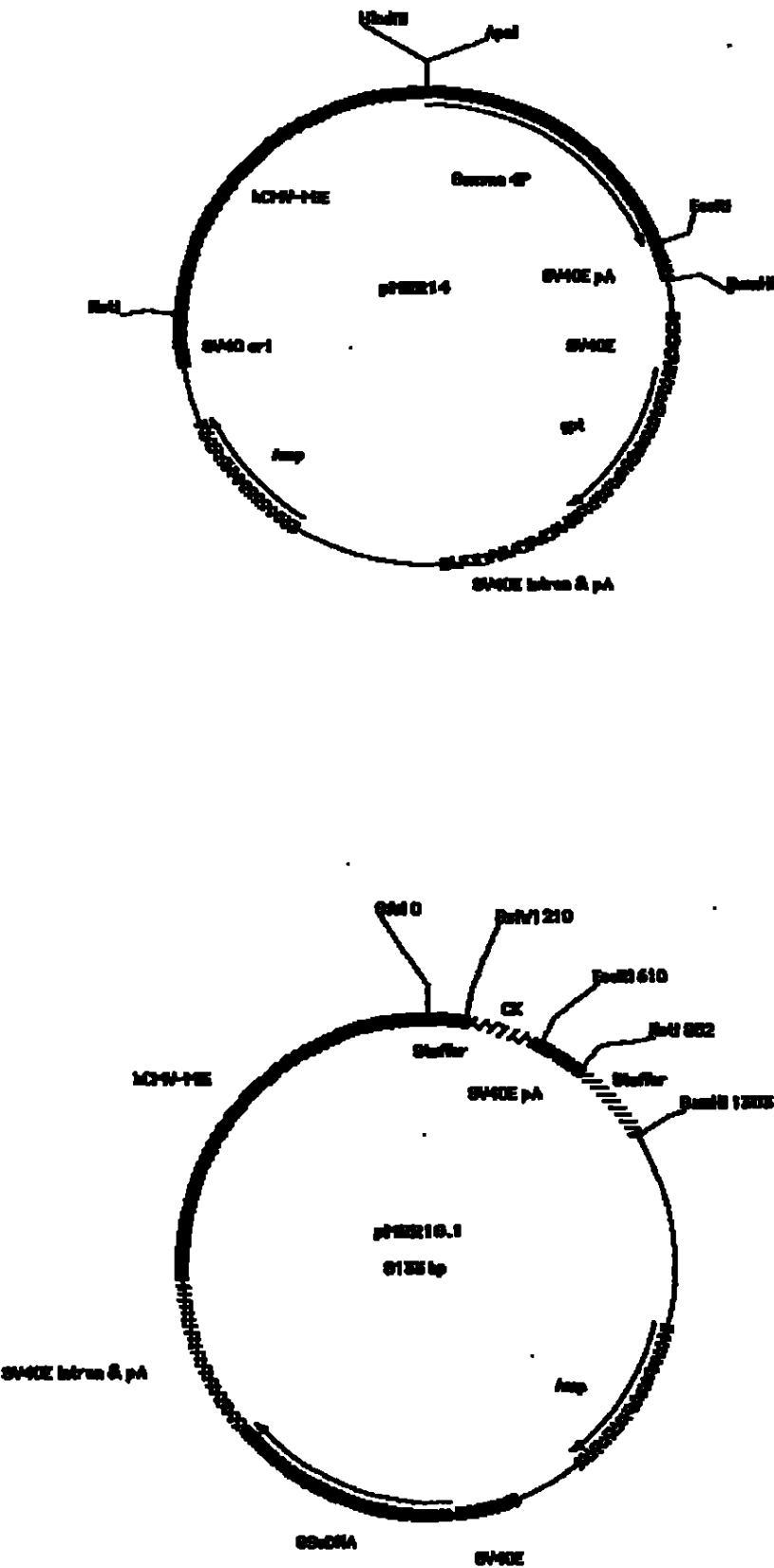


Figure 8: Biacore assay of chimeric 5/44 and mutants

5/44	$K_a \text{ s}^{-1}$	$K_d \text{ s}^{-1}$	$KD \text{ s}^{-10}$	$\sim KD \text{ nM}$
cLcH	2.9	1.14	3.93	0.4
N55Q	5.81	1.9	3.27	0.3
T57A	7.8	0.51	0.66	0.07
K60R	4.95	1.01	2.04	0.2

Figure 9: Oligonucleotides for 5/44 gH1 and gL1 gene assemblies**Heavy Chain****544gH1 T1**

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCA
AAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

544gH1 T2

GTGGCATTAAATCCCGGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3

AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCCGCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGTC
ACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2

GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTCCTCGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

Figure 9 cont.**Light Chain****544 gL1 T1**

GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGGA
GACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATTT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3

AGATTTCCGCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

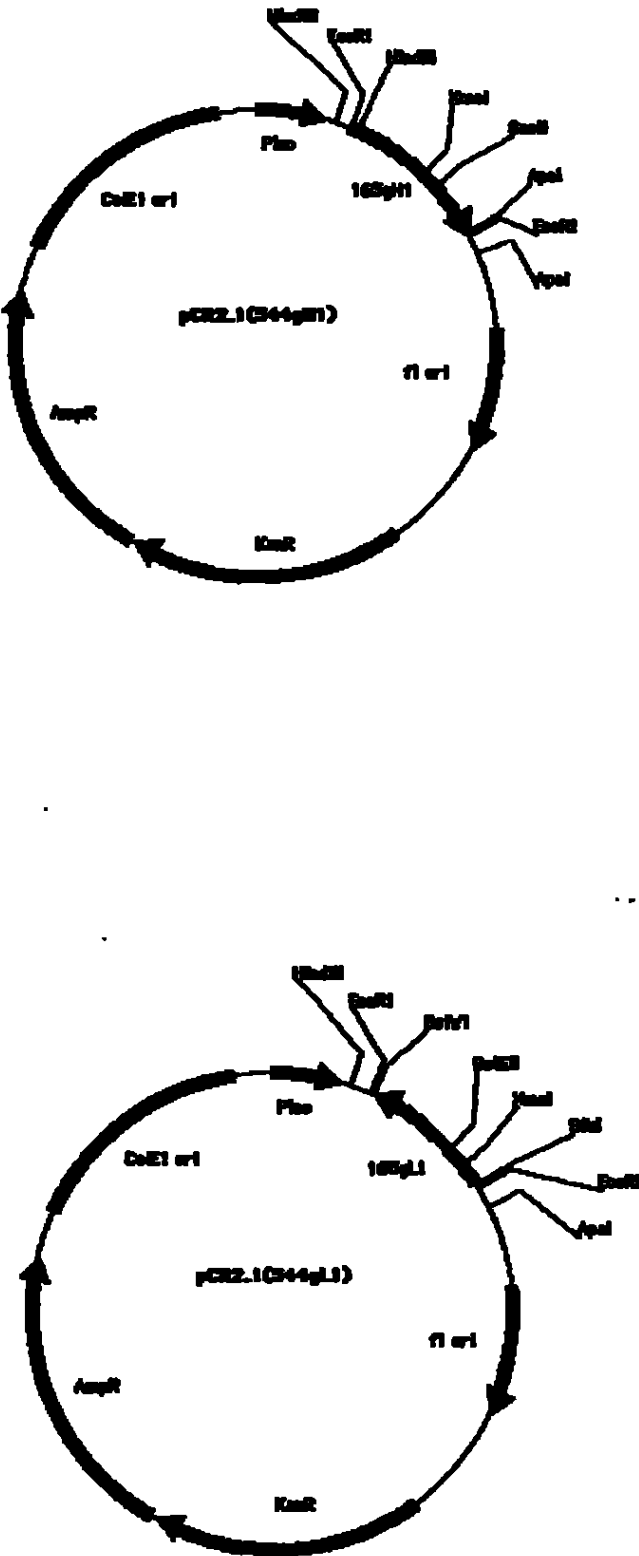
544gL1 F1

GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC

Figure 10: Plasmid maps of intermediate vectors pCR2.1 (544gH1) and pCR2.1(544gL1)



12/19

Figure 11: Oligonucleotide cassettes used to make further grafts

gH4

<u>XbaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC	GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC					
	C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG					
P	G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A					

gH5

<u>XbaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC	GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC					
	C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG					
P	G N N Y A T Y R R K P Q G R V T M T A					

gH6

<u>XbaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC	GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC					
	C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG					
P	G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A					

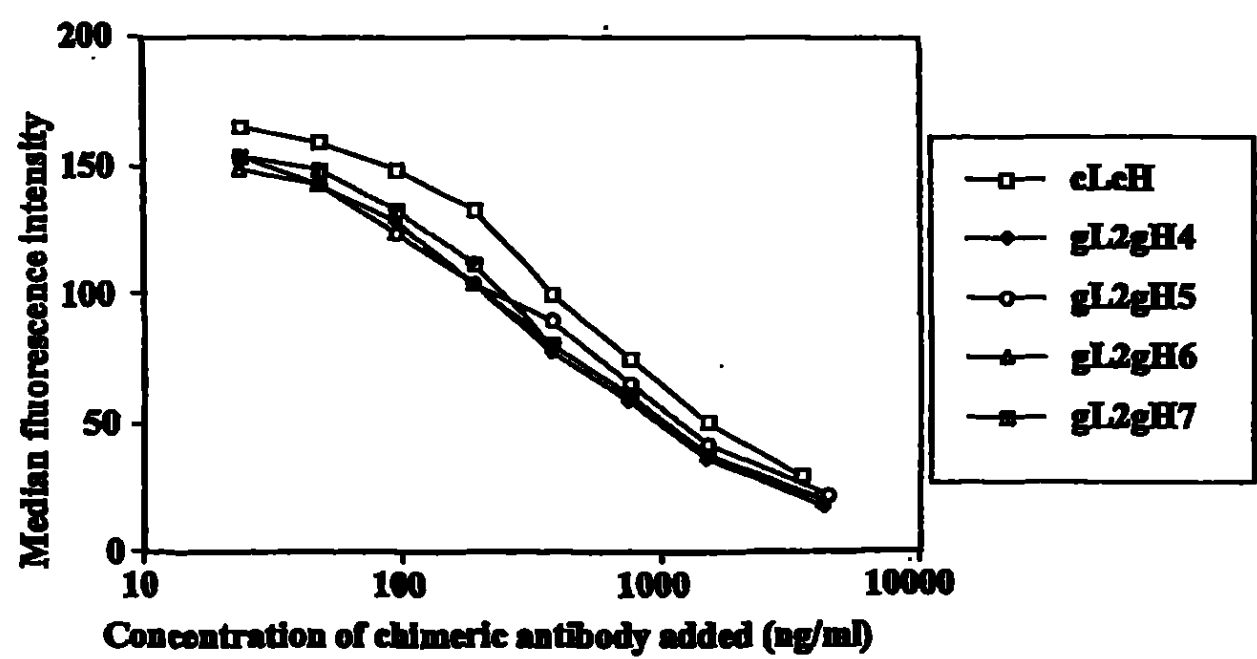
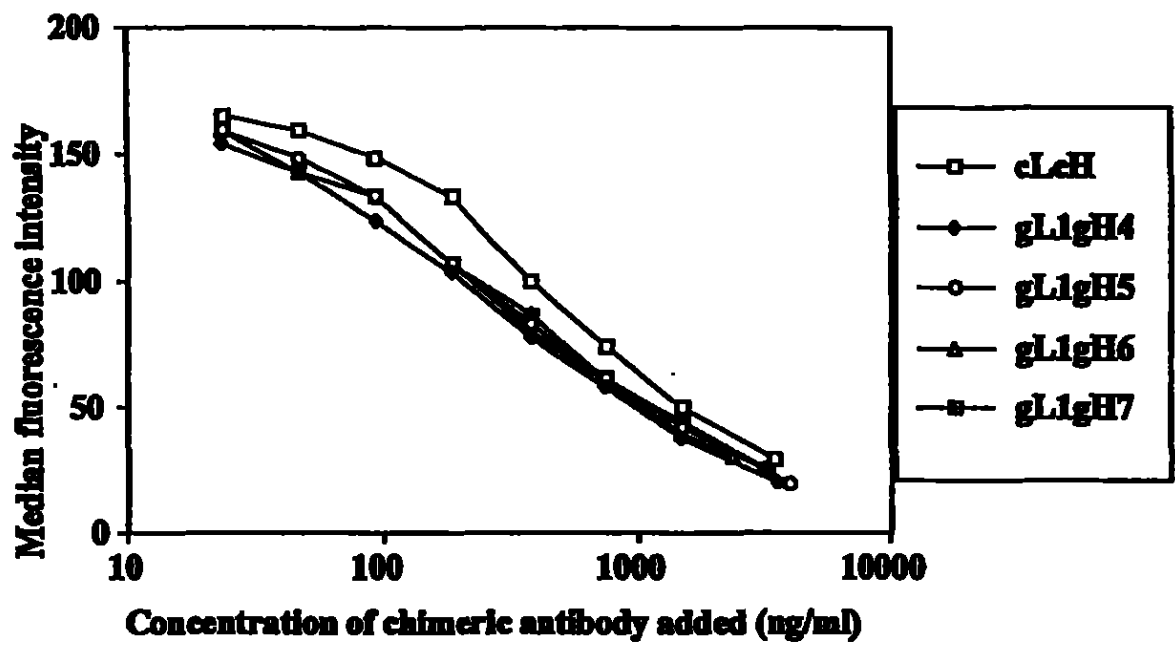
gH7

<u>XbaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC	GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC					
	C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG					
P	G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A					

g12

<u>XbaI</u>	10	20	30	40	50	60	<u>BstXI</u>
C	CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GCA GAC CCG						
	CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG						
S	R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T						

Figure 12: Competition assay, competing binding of fluorescently labelled mouse 5/44 antibody with grafted variants.



54

Figure 13: Full DNA sequences of grafted heavy and light chains**a) Heavy Chain**

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCOC CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTGGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M D F G F S L V F L A L I L K>

      70      80      90      100     110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT OCT CST CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G V Q C E V Q L V Q S G A E V K K F G>

120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCS ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A S V K V S C K A S G Y R F T N Y W D>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCS GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
E W V R Q A P G Q G L E W I G G I N F>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TOC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
G N N Y A T Y R R K F Q G R V T N T A>

290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
A V Y Y C T R E G Y G N Y G A W F A Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V>

460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TOC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CCG CGG GAC CCS ACG
F P L A P C S R S T S E S T A A L G C>

```

Figure 13 cont.

520 530 540 550 560 570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CCG GAC
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

580 590 600 610 620 630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AAG AGT CCT GAG ATG AAG GAG
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L>

640 650 660 670 680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AAG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690 700 710 720 730 740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
V D H K P S N T K V D K R V>

750 760 770 780 790 800 810
AGCACAGGGA GGGAGGCTGT CTGCTGGAG CCAGGCTCAG CCCTCTCGCC TGGACGACCC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCACCA GACGACCTTC GGTCCGATC GGGAGGACCG ACCTGCGTGG GGGCGACAGC

820 830 840 850 860 870 880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCCTCTGAC CACCCACTC
TCGGGGTCGG GTCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCTT CCGAGACTG GTGGGGTGAG

890 900 910 920 930 940 950
ATGCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTTT CCACAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGCTGGA TGGCCCTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAA GGTGGTCCGA GGGCCGTCGG TGTCCGACTT ACSSGGATGG

960 970 980 990 1000 1010 1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAGAG CCAATACCGG GAGGACCCTG
GGTCGGGGAC GCGTATGTCC CCGTCCACGA CGCAGTCTG GACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCTGGGAC

1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
CCCTGACCT AAGCCCAACC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCTCCCA
GGGACTGGA TTGGGGTGGG GTTTCGGGT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAG AGAGGAGGGT

1100 1110 1120 1130 1140 1150
GATCTGAGTA ACTCCCATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGGAGC T CTC AAG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

16/19

Figure 13 cont.

1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
 TGC CCA GGT AAGCCACCC AGGCTCSCC CTCACGCTCA AGCCGGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTEC
 ACG GGT CCA TTCGGTGGG TCCGGAGCGG GAGGTGAGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACG
 C P>

1230 1240 1250 1260 1270 1280
 ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA SCA CCT GAG TTC
 TAGGTCCCTG TCCGGGTGCG GCCCAGGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CST GGA CTC AAG
 A P E P>

1290 1300 1310 1320 1330 1340
 CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
 GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
 L G G P S V F L F P P K P K D T L M I>

1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
 AAG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
 S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E>

1410 1420 1430 1440 1450
 GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CMT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
 CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC
 V Q F N W Y V D G V E V H H A K T K P>

1460 1470 1480 1490 1500 1510
 CCG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CST GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L E>

1520 1530 1540 1550 1560 1570
 CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
 GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P>

1580 1590 1600 1610 1620 1630
 TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCHAGGGC
 AAG AAG TAG CTC TTT TGG TAG AAG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCCC CACGCTCCCG
 S S I E K T I S K A E>

1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CACATGGACA GAGGTGAGCT CGGCCCACCC TCTGCCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCACCC TCTGTCCCTA
 GTGTACCTGT CTCCASTCGA GCGGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGGCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

17/19

Figure 13 cont.

1710 1720 1730 1740 1750
 CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
 GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
 G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M>

1760 1770 1780 1790 1800 1810
 ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
 TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I>

1820 1830 1840 1850 1860 1870
 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
 CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
 A V E W E S N G Q P E E E Y K T T P P>

1880 1890 1900 1910 1920
 GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
 CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
 V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S>

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
 TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
 R W Q E G H V F S C S V M E E A L E M>

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
 GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AEA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGCCG
 H Y T Q K S L S L S L G K +>

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110
 AAGCCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTCC CCGAGGATG CTGGGCAAGT ACCCGCTCA CATACTTCCC
 TTGGGGGBCG AGGGGCCCCA GAGCCCCAGC GCGCTCCTAC GAACCGTCCA TGGGGCAGAT GTATGAGGG

2120 2130 2140 2150 2160
 AGGCACCCAG CATGGAAATA AAGCACCCAC CACTGCCCTG GCTCGAATC
 TCCGTGGGTC GTACCTTAT TTGTTGGGTG GTGACGGGAC CGAGCTTAG

Figure 13 cont.

b) Light Chain

10 20 30 40 50 60
 TTCGAAGCAG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
 AAGCTTCGAC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
 M K L P V R L L V L L L F W I>

70 80 90 100 110
 CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
 GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
 P A S R G D V Q V T Q S P S S L S A S>

120 130 140 150 160 170
 GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
 CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
 V G D R V T I T C R S S Q S L A N S Y>

180 190 200 210 220 230
 GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
 CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
 G N T F L S W Y L H K P G K A P Q L L>

240 250 260 270 280
 ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
 TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG OCT
 I Y G I S N R F S G V P D R F S G S G>

290 300 310 320 330 340
 AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
 TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CCG TGA
 S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T>

350 360 370 380 390 400
 TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
 ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
 Y Y C L Q G T H Q P Y T F G Q G T K V>

410 420 430 440 450
 GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
 CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
 E I K R T V A A P S V F I F P P S D E>

460 470 480 490 500 510
 CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
 GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
 Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R>

Figure 13 cont.

520 530 540 550 560 570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E>

580 590 600 610 620 630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T>

640 650 660 670 680
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTS TTT CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q>

690 700 710 720 730 740
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GCA GAG TGT TAG AGGGA
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
G L S S P V T K S F N R G E C *>

750 760 770 780
GAAGTGGCCC CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGGGAAAT C
CTTCACGGGG GTGGACGGAGG AGTCAGGTC GAACCCCTTAA G

60

SEQUENCE LISTING

<110> Celltech R&D Limited

<120> BIOLOGICAL PRODUCTS

<160> 51

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> mouse monoclonal 5/44 CDR-H1

<400> 1

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> mouse monoclonal 5/44 CDR-H2

<400> 2

Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> mouse monoclonal 5/44 CDR-H3

<400> 3

Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> mouse monoclonal 5/44 CDR-L1

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <221> mouse monoclonal 5/44 CDR-L2

<400> 5
 Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <221> mouse monoclonal 5/44 CDR-L3

<400> 6
 Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <221> mouse monoclonal 5/44 VL domain

<400> 7
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Thr Ile Lys Pro Gln Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 8
 <211> 121

WO 03/093320

PCT/GB03/01934

3

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> mouse monoclonal 5/44 VH domain

<400> 8

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

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

Trp	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35						40					45			

Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Gly	Asn	Asn	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Asn	Leu
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80

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

Thr	Arg	Glu	Gly	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
		100						105					110		

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115						120	

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<220>

<221> cH

<400> 9

Gly	Asn	Asn	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Asn	Leu	Lys	Gly
1				5						10		

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<220>

<221> N55Q

<400> 10

Gly	Asn	Gln	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Asn	Leu	Lys	Gly
1				5						10		

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> T57A

<400> 11
 Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> T57V

<400> 12
 Gly Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221> CDR-H2 (T57A) H'

<400> 13
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> K60R

<400> 14
 Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 15

<211> 17
<212> PRT
<213>

<220>
<221> CDR-H2 (K60R) H''

<400> 15
Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213>

<220>
<221> CDR-H2 (T57A K60R) H'''

<400> 16
Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapien

<220>
<221> DPK9

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
65 70

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> JKL

<400> 18
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> gL1

<400> 19
Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 X 5 X 10 X X 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 X X 25 30
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45 X
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 X 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> gL2

<400> 20
Asp Val Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 25 30
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DF7

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
20 25 30
Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Phe Gln Gly
35 40 45
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
50 55 60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
65 70 75 80

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> JH4

<400> 22
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>

<221> gH1

<400> 23

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Gln Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu
50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<220>

<221> gH4

<400> 24

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

68

115 120

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> gH5

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> gH6

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> gH7

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> Full sequence of grafted light chain

<400> 28

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15
Ala Ser Arg Gly Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys
50 55 60
Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

- <210> 29
- <211> 781
- <212> DNA
- <213>

<220>
<221> Full DNA sequence of grafted light chain

<400> 29
ttcgaagcog ccaccatgaa gttgcctggt aggcgtgttg tgcttctgtt gttctggatt 60
cctgcttccc ggggtgacgt tcaagtgacc cagagcccat ccagcctgag cgcactctgta 120
ggagaccggg tcaccatcac ttgtagatcc agtcagagtc ttgcaaacag ttatgggaac 180
acctttttgt cttggtatct gcacaaacca ggtaaagccc cacaattgct catctacgga 240
atctctaaca gatttagtgg tgtaccagac aggttcagcg gttccggaag tggtagtga 300
ttcaccctca cgaatctgtc tctccagcca gaagatttcg ccacttatta ctgtttacaa 360
ggtacacatc agcogtacac attcgggtcag ggtactaaag tagaatcaa acgtacggtta 420

ggggccccat ctgtcttcat ctccccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc 480
 tctgtttgtgt gctgtgtgaa taactttctat cccagagagg ccaagtaca gtggaaggtg 540
 gataacgccc tccaatcggg taactccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 600
 agcacctaca gctcagcag caccctgaag ctgagcaag cagactacga gaaacacaaa 660
 gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 720
 aggggagagt gttagaggga gaagtgcgcc caoctgctcc tcagttccag cctgggaatt 780
 c 781

<210> 30
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> Full sequence of grafted heavy chain

<400> 30
 Met Asp Phe Gly Phe Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg
 65 70 75 80
 Arg Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Gly Lys
 465

<210> 31
 <211> 2160
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> Full DNA sequence of grafted heavy chain

<400> 31

aagcttgccg	ccaccatgga	cttcggattc	tctctcgtgt	tcctggcact	cattctcaag	60
ggagtgcagt	gtgaggtgca	attggtccag	tcaggagcag	aggttaagaa	gcctggtgct	120
tcctgcaang	tttcgtgtaa	ggctagcggc	tacaggttca	caaattattg	gattcattgg	180
gtcaggcagg	ctccgggaca	aggcctggaa	tggatcgggtg	gcattaatcc	cggaataaac	240
tacgctacat	ataggagaaa	attccagggc	agagttacga	tgaccgcgga	caectocaca	300
agcactgtct	acatggagct	gtcatctctg	agatccgagg	acaccgcagt	gtactattgt	360
actagagaag	gctacggtaa	ttacggagcc	tggttcgect	actggggcca	gggtacccta	420
gtcacagtct	cctcagcttc	tacaaggggc	ccatccgtct	tccccctggc	gccctgctcc	480
aggagcaoct	ccgagagcac	agcgcctcg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttcccgaa	540
ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttcccggt	600
gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc	660
ttggggcacga	agacctacac	ctgcaacgta	gatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	720
aagagagttg	gtgagaggcc	agcacaggga	gggagggtgt	ctgctggaag	ccagggtcag	780
coctectgoc	tggacgcacc	ccggctgtgc	agccccagcc	cagggcagca	aggcatgcc	840
catctgtctc	ctcaccogga	ggcctctgac	caccccactc	atgcccaggg	agagggctct	900
ctggattttt	ccaocaggct	ccgggcagcc	acaggctgga	tgccccacc	ccaggccctg	960
cgcatacagg	ggcaggtgct	gcgtcagac	ctgccaagag	ccatatcogg	gaggaccctg	1020
cccctgacct	aagccaccc	caaaggccaa	actctccact	ccctcagctc	agacaacctc	1080
tctcotccca	gatctgagta	actcccaatc	ttctctctgc	agagtcacaa	tatggtcccc	1140
catgcccacc	atgcccaggt	aagccaaacc	aggcctcgcc	ctccagctca	aggcgggaca	1200
ggtgccctag	agtagcctgc	atccaggga	aggccccagc	cggtgtctga	cgcatccacc	1260
tccatctctt	cctcagcacc	tgagttcctg	gggggaccat	cagtcttctt	gttccccca	1320
aaacccaagg	acactctcat	gatctccogg	acccctgagg	tcacgtgogt	ggtggtggac	1380
gtgagccagg	aagacccoga	ggtccagttc	aactggtagc	tggatggcgt	ggaggtgcat	1440
aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	ttcaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	1500
ctcaccgtoc	tgcaccagga	ctggctgaac	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	1560
aaaggcctcc	cgtcctccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaagggtg	gacccacggg	1620
gtgcgagggc	cacatggaca	gaggtcagct	cggcccaccc	tctgccctgg	gagtgacgc	1680
tgtgccaacc	tctgtccta	cagggcagcc	ccgagagcca	caggtgtaca	ccctgcccc	1740
ctccaggag	gagatgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcttggtca	aaggcttcta	1800
ccccagcgac	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	1860
cacgcctccc	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcttc	tacagcaggc	taaccgtgga	1920
caagagcagg	tggcaggagg	ggaatgtctt	ctcatgtctc	gtgatgcatg	aggctctgca	1980
caaccactac	acacagaaga	gcctctccct	gtctctgggt	aatgagtg	cagggccggc	2040
aagcccccgc	tccccgggct	ctcggggctg	cgcgaggatg	cttggcacgt	accccgctta	2100
catacttccc	aggcaccag	catggaata	aagcaccac	cactgccctg	gtcogaattc	2160

<210> 32
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> 544gH1 T1

<400>	32	
agtgtgaggt	gcaattgggtc	cagtcaggag
aagtttcgtg	taaggctagc	ggctacaggt
tcac		
		60
		94

<210> 33
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>

74

<221> 544gH1 T2

<400> 33
gtggcattaa tcccggaat cagtacacta catataaaag aaatctaaag ggcagagcaa 60
cgctgacgc ggacacctcc acaagcactg totaca 96

<210> 34
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gH1 T3

<400> 34
agagaaggct acggttaatta cggagcctgg ttgcctact ggggccaggg tacctagtc 60
acagtctct cagcttctac aaagggccca agaaa 95

<210> 35
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544 gH1 B1

<400> 35
ggaccaattg cacctcacac tgcactccct tgagaatgag tgccaggaac acgagagaga 60
atcogaagtc catggtggcg gcaagctttt attc 94

<210> 36
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gH1 B2

<400> 36
gattcccggy attaatgcca ccgataccatt ccaggccttg tcccgagacc tgccctgacc 60
aatgaatcca ataatttgty aacctgtagc cgctagc 97

<210> 37
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gH1 B3

25

<400> 37
cgtaattacc gtagccttct ctagtacaat agtacactgc ggtgtcctcg gatctcagag 60
atgacagctc catgtagaca gtgcttgtgg agg 93

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gH1 F1

<400> 38
gaataaaagc ttgccgccac c 21

<210> 39
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gH1 R1

<400> 39
ttttcttgggc cctttgtaga ag 22

<210> 40
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544 gL1 T1

<400> 40
gcttcccggg gtgacgttca agtgacccag agcccatcca gectgagcgc atctgtagga 60
gaccgggtca ccatcacttg tagatcc 87

<210> 41
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544 gL1 T2

<400> 41
tatctgcaca aaccaggtaa agccccacaa ttgctcatct acggaatctc taacagattt 60

76

agtgggtgtac cagacagggt cagcgggtcc 90

<210> 42
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> 544gL1 T3

<400> 42
 agatttcgcc acttattact gtttacaagg tacacatcag ccgtacacat tcggtcaggg 60
 tactaanagta gaatatcaaac gtacggcgtg c 91

<210> 43
 <211> 88
 <212> DNA
 <213>

<220>
 <221> 544gL1 B1

<400> 43
 gaacgtcacc ccgggaagca ggaatccaga acaacagaag caccaacagc ctaacaggca 60
 acttcattgtt ggcggcttcg aatcatcc 88

<210> 44
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> 544gL1 B2

<400> 44
 ctttacctgg tttgtgcaga taccaagaca aaaagggtgtt ccataactg ttgcaagac 60
 tctgactgga tctacaagtg atggtgac 88

<210> 45
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223>

<220>
 <221> 544gL1 B3

<400> 45
 aacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggagagacga gatcgtgagg gtgaantcag 60
 taccacttcc ggaaccgctg aacctgtctg 90

<210> 46
 <211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<220>
<221> 544gI1 F1

<400> 46
ggatgattcg aagccgccac 20

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

<220>
<221> 544gI1 R1

<400> 47
gcacgccgta ogtttgattt c 21

<210> 48
<211> 339
<212> DNA
<213> mouse

<220>
<221> DNA sequence of mouse monoclonal 5/44 VL

<400> 48
gatgttgtgg tgactcaaac tccactctcc ctgcctgtca gctttggaga tcaagtttct 60
atctcttgca ggtctagtc gagtcttgca aacagttatg ggaacacctt tttgtcttgg 120
tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctctcatct atgggatttc caacagattt 180
tctgggtgc cagacagggt cactggcagt gggtcagggc cagatttcac actcaagatc 240
agcacaataa agcctgagga ctggggaatg tattactgct tacaaggtag acatcagccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa atanaacgt 339

<210> 49
<211> 363
<212> DNA
<213> mouse

<220>
<221> DNA sequence of mouse monoclonal 5/44 VH

<400> 49
gaggtccaac tgcagcagtc tgggactgta ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60
tcttgcaagg cttctggcta caggtttacc aactactgga ttactgggt aaaacagagg 120
cctgggcagg gtctagaatg gattggtggt attaatcctg gaaataatta tactacgtat 180
aagaggaact tgaagggcaa ggccacactg actgcagtc catcggccag cactgcctac 240
atggacctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggtct attactgtac aagagagggc 300
tatggttaact acggggcctg gtttgcttac tggggccagg ggactctggt cacogtctcc 360
tca 363

<210> 50
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence within oligonucleotide primer

<400> 50

gccgccacc

9

<210> 51

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' oligonucleotide primer

<400> 51

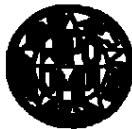
gcgcgcaagc ttgccgccac catggacttc ggattctctc tcgtgttctt ggcactcatt
ctcaagggag tgcagtgtga ggtgcagctc gtcgagtctg g

60

101

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/093320 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 16/28,
C12N 15/13, 15/85, 5/10, A61K 39/395, 31/7088, A61P
35/00

(21) International Application Number:
PCT/GB2003/001934

(22) International Filing Date: 2 May 2003 (02.05.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0210121.0 2 May 2002 (02.05.2002) 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) Inventor; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): POPPLEWELL,
Andrew, George [GB/GB]; Celltech R & D Limited, 208
Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). TICKLE,
Simon, Peter [GB/GB]; Celltech R & D Limited, 208 Bath
Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). LADYMAN,
Heather, Margaret [GB/GB]; Celltech R & D Limited,
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, NI, NQ, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, 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),
European patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
5 February 2004

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

WO 2003/093320 A3

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR HUMAN CD22 AND THEIR THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC USES

(57) Abstract: There is disclosed antibody molecules containing at least one CDR derived from a mouse monoclonal antibody having specificity for human CD22. There is also disclosed a CDR grafted antibody wherein at least one of the CDRs is a modified CDR. Further disclosed are DNA sequences encoding the chains of the antibody molecules, vectors, transformed host cells and uses of the antibody molecules in the treatment of diseases mediated by cells expressing CD22.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/GB 03/01934

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC 7 C07K16/28 C12N15/13 C12N15/85 C12N5/10 A61K39/395
 A61K31/7088 A61P35/00

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 basis used)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, MPI Data, PAJ, EPO-Internal, 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	S. LEUNG ET AL.: "Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 32, no. 17/18, December 1995 (1995-12), pages 1413-1427, XP000942678 Oxford, GB the whole document	1-45
X	WO 96 04925 A (IMMUNOMEDICS, INC.) 22 February 1996 (1996-02-22) cited in the application examples claims	1-45
-/-		

☒ 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 have decided on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see Appendix)

"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 considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document number of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2003

Date of mailing of the international search report

25/11/2003

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.O. Box 1, 8010 Paternoster 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-3040, Telex 51 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/01934

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 94585 A (CELLTECH R & D LTD. ET AL.) 13 December 2001 (2001-12-13) claims	23-29
X	WO 92 15683 A (MERCK PATENTGESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG) 17 September 1992 (1992-09-17) see fig. 4-2, FR-4	45
X	WO 94 29451 A (CELLTECH LIMITED) 22 December 1994 (1994-12-22) see SEQ ID NO:42	45
A	S. LEUNG ET AL.: "Effect of V _k framework-1 glycosylation on the binding affinity of lymphoma-specific murine and chimeric LL2 antibodies and its potential use as a novel conjugation site." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 60, 1995, pages 534-538, XP002066554 New York, NY, USA page 534, left-hand column page 537, left-hand column, line 14 - line 38	1-45
A	US 5 714 350 A (CO ET AL.) 3 February 1998 (1998-02-03) column 13-16	1-45
A	I. BENHAR ET AL.: "Mutations of two lysine residues in the CDR loops of a recombinant immunotoxin that reduce its sensitivity to chemical derivatization." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, July 1994 (1994-07), pages 321-326, XP000564453 Washington, DC, USA abstract page 321, left-hand column, line 30 -right-hand column, line 7	1-45
A	WO 91 09967 A (CELLTECH LIMITED) 11 July 1991 (1991-07-11) cited in the application abstract	1-45
A	T. VAUGHAN ET AL.: "Human antibodies by design." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, June 1998 (1998-06), pages 535-539, XP000941675 New York, NY, USA cited in the application the whole document	20

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/BA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-3, 5-11, 19, 20, 30-44 (all partially)

Present claims 1-3, 5-11, 19, 20, 30-44 relate to an extremely large number of possible antibodies. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the antibodies claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies disclosed in the examples of underlying application.

Present claims 19, 20 and 30-44 (all partially) relate to an antibody defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an improved affinity. The claims cover all antibodies having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such antibodies. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the antibody by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies disclosed in the examples of underlying application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(a) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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:
Although claims 33-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1-3, 5-11, 19, 20, 30-44 (all partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

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.:

Remark on Protest

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

84

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International

application No

PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604925 A	22-02-1996	AU 3272695 A	07-03-1996
		CA 2195557 A1	22-02-1996
		EP 0771208 A1	07-05-1997
		IL 114909 A	28-10-1999
		JP 3053873 B2	19-06-2000
		JP 10505231 T	26-05-1998
		WO 9604925 A1	22-02-1996
		US 6187287 B1	13-02-2001
		US 5789554 A	04-08-1998
		US 2002102254 A1	01-08-2002
WO 0194585 A	13-12-2001	AU 6051101 A	17-12-2001
		BG 106278 A	29-12-2002
		BR 0106682 A	14-05-2002
		CA 2380298 A1	13-12-2001
		CN 1383450 T	04-12-2002
		CZ 20020837 A3	15-05-2002
		DE 10192353 T0	22-05-2003
		EP 1287140 A1	05-03-2003
		WO 0194585 A1	13-12-2001
		GB 2366800 A	20-03-2002
		HU 0202346 A2	28-10-2002
		NO 20020554 A	08-04-2002
		SK 3152002 A3	02-07-2002
		US 2003026805 A1	06-02-2003
		US 2002151682 A1	17-10-2002
WO 9215683 A	17-09-1992	AT 247168 T	15-08-2003
		AU 658396 B2	13-04-1995
		AU 1340392 A	06-10-1992
		CA 2082160 A1	07-09-1992
		CZ 9203327 A3	16-02-1994
		CZ 9603337 A3	17-06-1998
		DE 69233153 D1	18-09-2003
		WO 9215683 A1	17-09-1992
		EP 0531472 A1	17-03-1993
		HU 65687 A2	28-07-1994
		IE 920705 A1	09-09-1992
		JP 5506157 T	16-09-1993
		KR 240308 B1	15-01-2000
		MX 9201016 A1	01-08-1993
		PT 100195 A ,B	31-05-1993
		SK 281143 B6	11-12-2000
		SK 332792 A3	03-07-1996
		US 5558864 A	24-09-1996
		ZA 9201661 A	25-11-1992
WO 9429451 A	22-12-1994	AT 208820 T	15-11-2001
		AU 691811 B2	28-05-1998
		AU 6934194 A	03-01-1995
		AU 694926 B2	06-08-1998
		AU 6934294 A	03-01-1995
		CA 2163344 A1	22-12-1994
		CA 2163345 A1	22-12-1994
		DE 69429095 D1	20-12-2001
		DE 69429095 T2	12-09-2002
		EP 0714409 A1	05-06-1996
		EP 0715653 A1	12-06-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429451	A	WO 9429351 A2	22-12-1994
		WO 9429451 A2	22-12-1994
		JP 8511420 T	03-12-1996
		JP 8511421 T	03-12-1996
		US 6180377 B1	30-01-2001
US 5714350	A 03-02-1998	US 2003054497 A1	20-03-2003
		US 6350861 B1	26-02-2002
WO 9109967	A 11-07-1991	AT 129017 T	15-10-1995
		AT 124459 T	15-07-1995
		AT 159299 T	15-11-1997
		AT 208794 T	15-11-2001
		AU 664801 B2	30-11-1995
		AU 6461294 A	22-12-1994
		AU 646009 B2	03-02-1994
		AU 6974091 A	24-07-1991
		AU 649645 B2	02-06-1994
		AU 7033091 A	24-07-1991
		AU 631481 B2	26-11-1992
		AU 7048691 A	24-07-1991
		BE 60462 B1	28-04-1995
		BR 9007197 A	28-01-1992
		CA 2037607 A1	07-09-1992
		CA 2046904 A1	22-06-1991
		CA 2050479 A1	22-06-1991
		DE 69020544 D1	03-08-1995
		DE 69020544 T2	18-01-1996
		DE 69022982 D1	16-11-1995
		DE 69022982 T2	28-03-1996
		DE 69031591 D1	20-11-1997
		DE 69031591 T2	12-03-1998
		DE 69033857 D1	20-12-2001
		DE 69033857 T2	12-09-2002
		DK 460167 T3	20-11-1995
		DK 460171 T3	28-08-1995
		DK 460178 T3	22-12-1997
		DK 626390 T3	11-03-2002
		EP 0460167 A1	11-12-1991
		EP 0460171 A1	11-12-1991
		EP 0460178 A1	11-12-1991
		EP 0620276 A1	19-10-1994
		EP 0626390 A1	30-11-1994
		ES 2079638 T3	16-01-1996
		ES 2074701 T3	16-09-1995
		ES 2112270 T3	01-04-1998
		ES 2165864 T3	01-04-2002
		FI 108777 B1	28-03-2002
		FI 108776 B1	28-03-2002
		FI 108917 B1	30-04-2002
		FI 990875 A	19-04-1999
		WO 9109966 A1	11-07-1991
		WO 9109967 A1	11-07-1991
		WO 9109968 A1	11-07-1991
		GB 2246781 A ,B	12-02-1992
		GB 2246570 A ,B	05-02-1992
		GB 2268744 A ,B	19-01-1994
		GB 2268745 A ,B	19-01-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO 9109967	A	GR 3017734 T3	31-01-1996

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) P030498WOBox 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
United Kingdom

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
CELLTECH R&D LIMITED
208 Bath Road
Slough
Berkshire SL1 3WE
United Kingdom

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
CELLTECH R&D LIMITED
208 Bath Road
Slough
Berkshire SL1 3WE
United Kingdom

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.)

LADYMAN, Heather Margaret
CELLTECH R&D LIMITED
208 Bath Road
Slough
Berkshire SL1 3WE
United Kingdom

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

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, SI Slovenia, 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 | ☐ SC Seychelles |
| ☐ 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 | ☐ SK Slovakia |
| ☐ BZ Belize | ☐ KZ Kazakhstan | ☐ SL Sierra Leone |
| ☐ CA Canada | ☐ LC Saint Lucia | ☐ TJ Tajikistan |
| ☐ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☐ LK Sri Lanka | ☐ TM Turkmenistan |
| ☐ CN China | ☐ LR Liberia | ☐ TN Tunisia |
| ☐ CO Colombia | ☐ LS Lesotho | ☐ TR Turkey |
| ☐ CR Costa Rica | ☐ LT Lithuania | ☐ TT Trinidad and Tobago |
| ☐ CU Cuba | ☐ LU Luxembourg | ☐ TZ United Republic of Tanzania |
| ☐ CZ Czech Republic | ☐ LV Latvia | ☐ UA Ukraine |
| ☐ DE Germany | ☐ MA Morocco | ☐ UG Uganda |
| ☐ DK Denmark | ☐ MD Republic of Moldova | ☐ US United States of America |
| ☐ DM Dominica | ☐ MG Madagascar | ☐ UZ Uzbekistan |
| ☐ DZ Algeria | ☐ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | ☐ VC Saint Vincent and the Grenadines |
| ☐ EC Ecuador | ☐ MN Mongolia | ☐ VN Viet Nam |
| ☐ EE Estonia | ☐ MW Malawi | ☐ YU Yugoslavia |
| ☐ ES Spain | ☐ MX Mexico | ☐ ZA South Africa |
| ☐ FI Finland | ☐ MZ Mozambique | ☐ ZM Zambia |
| ☐ GB United Kingdom | ☐ NO Norway | ☐ ZW Zimbabwe |
| ☐ GD Grenada | | |
| ☐ GE Georgia | | |
| ☐ GH Ghana | | |

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

- ☐ .NI NIPROQUA
- ☐

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.*)

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
HOWICK, Nicholas Keith
FISHER, Adrian John
MERCER, Christopher Paul
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 Carpmasels & Ransford
43 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
United Kingdom

Tel: 0207 242 8682

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) 02/05/2002	0210121.0	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:		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):	Number of items
(a) In paper form, the following number of sheets:		1. ☒ fee calculation sheet	1
request (including declaration sheets)	6	2. ☐ original separate power of attorney	
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	25	3. ☐ original general power of attorney	
claims	8	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	
abstract	1	5. ☐ statement explaining lack of signature	
drawings	19	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	
Sub-total number of sheets:	57	7. ☐ translation of international application into (language):	
sequence listings	19	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	
tables related thereto	0	9. ☐ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)	
<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):	
Total number of sheets:	76	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	
(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	
(i) ☐ sequence listings		10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	
(ii) ☐ tables related thereto		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application)	
(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))		(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quarter)	
(i) ☐ sequence listings		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	
(ii) ☐ tables related thereto		11. ☒ other (specify): FORM 2377	1
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the: ☐ sequence listings: ☐ tables related thereto: <i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i>			
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: ENGLISH	

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE	
<i>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>	
	CHECKED Date: 2.5.03 By: VMC <i>Myland</i>
MERCER, Christopher Paul	

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

93

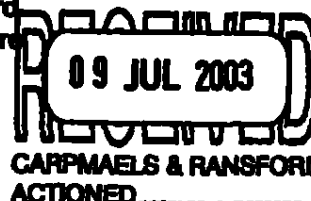
PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

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


Date of mailing (day/month/year) 25 June 2003 (25.06.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P030498WO	
International application No. PCT/GB03/01934	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant CELLTECH R&D LIMITED et al	International filing date (day/month/year) 02 May 2003 (02.05.03) Priority date (day/month/year) 02 May 2002 (02.05.02)

- 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(c) 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(c) 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
02 May 2002 (02.05.02)	0210121.0	GB	13 June 2003 (13.06.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.87.40	Authorized officer Guido SANVINCENTI Telephone No. (41-22) 338 8283
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P030498WO	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 03/ 01934	International filing date (day/month/year) 02/05/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02/05/2002
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 8 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:

ANTIBODIES SPECIFIC FOR HUMAN CD22 AND THEIR THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC USES

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.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/01934

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/28 C12N15/13 C12N15/85 C12N5/10 A61K39/395
A61K31/7088 A61P35/00

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)

BIOSIS, EMBASE, CHEM-ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, 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	S. LEUNG ET AL.: "Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 32, no. 17/18, December 1995 (1995-12), pages 1413-1427, XP000942678 Oxford, GB the whole document	1-45
X	WO 96 04925 A (IMMUNOMEDICS, INC.) 22 February 1996 (1996-02-22) cited in the application examples claims	1-45

-/-

☒ 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 claim 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
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2003

Date of mailing of the international search report

25/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noo1j, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/01934

Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 94585 A (CELLTECH R & D LTD. ET AL.) 13 December 2001 (2001-12-13) claims	23-29
X	WO 92 15683 A (MERCK PATENTGESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG) 17 September 1992 (1992-09-17) see fig. 4-2, FR-4	45
X	WO 94 29451 A (CELLTECH LIMITED) 22 December 1994 (1994-12-22) see SEQ ID NO:42	45
A	S. LEUNG ET AL.: "Effect of V κ framework-1 glycosylation on the binding affinity of lymphoma-specific murine and chimeric LL2 antibodies and its potential use as a novel conjugation site." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 60, 1995, pages 534-538, XP002066554 New York, NY, USA page 534, left-hand column page 537, left-hand column, line 14 - line 38	1-45
A	US 5 714 350 A (CO ET AL.) 3 February 1998 (1998-02-03) column 13-16	1-45
A	I. BENHAR ET AL.: "Mutations of two lysine residues in the CDR loops of a recombinant immunotoxin that reduce its sensitivity to chemical derivatization." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, July 1994 (1994-07), pages 321-326, XP000564453 Washington, DC, USA abstract page 321, left-hand column, line 30 -right-hand column, line 7	1-45
A	WO 91 09967 A (CELLTECH LIMITED) 11 July 1991 (1991-07-11) cited in the application abstract	1-45
A	T. VAUGHAN ET AL.: "Human antibodies by design." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, June 1998 (1998-06), pages 535-539, XP000941675 New York, NY, USA cited in the application the whole document	20

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1-3,5-11,19,20,30-44 (all partially)

Present claims 1-3, 5-11, 19, 20, 30-44 relate to an extremely large number of possible antibodies. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the antibodies claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies disclosed in the examples of underlying application.

Present claims 19, 20 and 30-44 (all partially) relate to an antibody defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an improved affinity. The claims cover all antibodies having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such antibodies. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the antibody by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies disclosed in the examples of underlying application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 03/01934

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:

Although claims 33-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1-3, 5-11, 19, 20, 30-44 (all partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

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.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604925	A	22-02-1996	AU 3272695 A	07-03-1996
			CA 2195557 A1	22-02-1996
			EP 0771208 A1	07-05-1997
			IL 114909 A	28-10-1999
			JP 3053873 B2	19-06-2000
			JP 10505231 T	26-05-1998
			WO 9604925 A1	22-02-1996
			US 6187287 B1	13-02-2001
			US 5789554 A	04-08-1998
			US 2002102254 A1	01-08-2002
WO 0194585	A	13-12-2001	AU 6051101 A	17-12-2001
			BG 106278 A	29-12-2002
			BR 0106682 A	14-05-2002
			CA 2380298 A1	13-12-2001
			CN 1383450 T	04-12-2002
			CZ 20020837 A3	15-05-2002
			DE 10192353 T0	22-05-2003
			EP 1287140 A1	05-03-2003
			WO 0194585 A1	13-12-2001
			GB 2366800 A	20-03-2002
			HU 0202346 A2	28-10-2002
			NO 20020554 A	08-04-2002
			SK 3152002 A3	02-07-2002
			US 2003026805 A1	06-02-2003
			US 2002151682 A1	17-10-2002
WO 9215683	A	17-09-1992	AT 247168 T	15-08-2003
			AU 658396 B2	13-04-1995
			AU 1340392 A	06-10-1992
			CA 2082160 A1	07-09-1992
			CZ 9203327 A3	16-02-1994
			CZ 9603337 A3	17-06-1998
			DE 69233153 D1	18-09-2003
			WO 9215683 A1	17-09-1992
			EP 0531472 A1	17-03-1993
			HU 65687 A2	28-07-1994
			IE 920705 A1	09-09-1992
			JP 5506157 T	16-09-1993
			KR 240308 B1	15-01-2000
			MX 9201016 A1	01-08-1993
			PT 100195 A ,B	31-05-1993
			SK 281143 B6	11-12-2000
			SK 332792 A3	03-07-1996
			US 5558864 A	24-09-1996
			ZA 9201661 A	25-11-1992
WO 9429451	A	22-12-1994	AT 208820 T	15-11-2001
			AU 691811 B2	28-05-1998
			AU 6934194 A	03-01-1995
			AU 694926 B2	06-08-1998
			AU 6934294 A	03-01-1995
			CA 2163344 A1	22-12-1994
			CA 2163345 A1	22-12-1994
			DE 69429095 D1	20-12-2001
			DE 69429095 T2	12-09-2002
			EP 0714409 A1	05-06-1996
			EP 0715653 A1	12-06-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429451 A		WO 9429351 A2	22-12-1994
		WO 9429451 A2	22-12-1994
		JP 8511420 T	03-12-1996
		JP 8511421 T	03-12-1996
		US 6180377 B1	30-01-2001
US 5714350 A	03-02-1998	US 2003054497 A1	20-03-2003
		US 6350861 B1	26-02-2002
WO 9109967 A	11-07-1991	AT 129017 T	15-10-1995
		AT 124459 T	15-07-1995
		AT 159299 T	15-11-1997
		AT 208794 T	15-11-2001
		AU 664801 B2	30-11-1995
		AU 6461294 A	22-12-1994
		AU 646009 B2	03-02-1994
		AU 6974091 A	24-07-1991
		AU 649645 B2	02-06-1994
		AU 7033091 A	24-07-1991
		AU 631481 B2	26-11-1992
		AU 7048691 A	24-07-1991
		BG 60462 B1	28-04-1995
		BR 9007197 A	28-01-1992
		CA 2037607 A1	07-09-1992
		CA 2046904 A1	22-06-1991
		CA 2050479 A1	22-06-1991
		DE 69020544 D1	03-08-1995
		DE 69020544 T2	18-01-1996
		DE 69022982 D1	16-11-1995
		DE 69022982 T2	28-03-1996
		DE 69031591 D1	20-11-1997
		DE 69031591 T2	12-03-1998
		DE 69033857 D1	20-12-2001
		DE 69033857 T2	12-09-2002
		DK 460167 T3	20-11-1995
		DK 460171 T3	28-08-1995
		DK 460178 T3	22-12-1997
		DK 626390 T3	11-03-2002
		EP 0460167 A1	11-12-1991
		EP 0460171 A1	11-12-1991
		EP 0460178 A1	11-12-1991
		EP 0620276 A1	19-10-1994
		EP 0626390 A1	30-11-1994
		ES 2079638 T3	16-01-1996
		ES 2074701 T3	16-09-1995
		ES 2112270 T3	01-04-1998
		ES 2165864 T3	01-04-2002
		FI 108777 B1	28-03-2002
		FI 108776 B1	28-03-2002
		FI 108917 B1	30-04-2002
		FI 990875 A	19-04-1999
		WO 9109966 A1	11-07-1991
		WO 9109967 A1	11-07-1991
		WO 9109968 A1	11-07-1991
		GB 2246781 A ,B	12-02-1992
		GB 2246570 A ,B	05-02-1992
		GB 2268744 A ,B	19-01-1994
		GB 2268745 A ,B	19-01-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 03/01934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9109967	A	GR 3017734 T3	31-01-1996

PPRODUCTOS BIOLÓGICOS

La presente invención se relaciona con una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para determinantes antigénicos del antígeno de linfocito CD22. La presente invención también se relaciona con los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y los métodos para producir la molécula de anticuerpo.

En una molécula de anticuerpo natural, existen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tienen en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto de cuatro regiones de estructura (FR) que alternan con tres regiones que determinan complementariedad (CDR). Los residuos en los dominios variables son convencionalmente numerados de acuerdo a un sistema inventado por Kabat *et al.* Este sistema se establece en Kabat *et al.*; en 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Departamento of Health and Human Services, NIH, USA (en los sucesivos "Kabat *et al.* (supra)"). Este sistema de enumeración se utiliza en la presente especificación a excepción de que se indique otra cosa.

Las designaciones del residuo de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácido. La secuencia de aminoácido lineal actual puede contener más pocos o adicionales aminoácidos que en la numeración Kabat estricta que corresponde a un acortamiento de, o a una inserción de, un componente estructural, sea de estructura o CDR, de la estructura del dominio variable básico. La numeración Kabat correcta de los residuos de puede determinar para un anticuerpo dado mediante alineamiento de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

Los CDR del dominio de variable de cadena pesada están localizados en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con la numeración Kabat.

Los CDR del dominio variable de cadena ligera están localizados en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo a la numeración Kabat.

5 La construcción de los anticuerpos injertados con CDR se describe en la solicitud de patente europea EP-A-0239400, que describe un proceso en el cual los CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón son injertados sobre las regiones de estructura de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida de sitio utilizando oligonucleótidos largos. Los CDR determinan
10 la especificidad que une el antígeno de los anticuerpos y son secuencias de péptido relativamente cortas llevadas sobre las regiones de estructura de los dominios variables.

El primer trabajo en la humanización de anticuerpos monoclonales mediante
15 injerto CDR se llevó a cabo en anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, los ejemplos en los cuales un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un lisosoma y un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce un antígeno sobre células T humanas fueron humanizados mediante injertos CDR habiendo sido descritas por Verhoeven *et al.* (Science, 239, 1534-1536,
20 1988) and Riechmann *et al.* (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

Riechmann *et al.* encontró que la transferencia de los CDR solos (como se definió por Kabat (Kabat *et al.* (*supra*) Y Wu *et al.* J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)). No fue suficiente para suministrar actividad de unión anfigena satisfactoria en el
25 producto injertado CDR. Se encontró que un número de residuos de estructura tenían que ser alterados de tal forma que ellos se correspondieran con aquellos de la región de estructura donadora. Los criterios propuestos para seleccionar cuales residuos de estructura necesitaban ser alterados se describen en la solicitud de Patente Internacional No. WO 90/07861.

30

Un número de revistas que discuten los anticuerpos injertados CDR han sido publicadas, incluyendo Vaughan *et al.* (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

Los linfomas malignos son un grupo diverso de neoplasmas. La mayoría de los casos ocurren en gente mayor. El linfoma Non-Hodgkins (NHL) es una enfermedad que habitualmente afecta 200,000 a 250,000 pacientes en Estados Unidos. Es el segundo cáncer con más rápido incremento en los Estados Unidos, peleándose a un índice de aproximadamente 55,000 nuevos casos por año. La incidencia se está elevando a un índice que es mayor del debido simplemente al incremento de la edad de la población y la exposición a los factores de riesgo conocidos.

10 La clasificación del linfoma es compleja, y ha evolucionado en las décadas recientes. En 1994 se introdujo la clasificación de linfomas Europeo-Americana revisada (REAL). La clasificación organiza los linfomas de la célula B (los más frecuentemente identificados), célula T y de origen no clasificado en subtipos acortados. En cada práctica, los grupos de NHL en categorías grado bajo, intermedio
15 y alto sobre la base de su apariencia histológica general, refleja ampliamente su comportamiento clínico.

Los NHL predominantemente afectan los nodos de linfoma pero, en pacientes individuales, el tumor puede involucrar otros sitios anatómicos tales como el hígado, bazo, médula espinal, pulmón, intestino y piel. La enfermedad comúnmente presenta un agrandamiento de los nodos linfáticos. El linfoma extranodal más frecuentemente afecta el intestino, aunque primariamente el linfoma de virtualmente cada órgano se ha documentado. Los síntomas sistémicos incluyen fiebre, sudor, cansancio, y pérdida de peso.

25

Hasta hace poco, el sistema de etapa Ann Arbor, basado completamente en la extensión anatómica de la enfermedad, era el mayor determinante de la terapia NHL. Esta información se puede refinar al incorporar indicadores de pronóstico adicionales, que incluyen la edad, niveles de sero lactato deshidrogenasa y estados de desempeño. Aún así, el conocimiento del sistema de etapas Ann Arbor, con el subtipo histológico e inmunológico del tumor, es aún el principal determinante del tratamiento.

30

El NHL de bajo grado tiene un curso indolente, con una supervivencia media de los pacientes de 8 a 10 años. La supervivencia es poco impactada por la terapia habitualmente disponible, aunque la irradiación de la enfermedad local y la quimioterapia para los síntomas sistémicos mejoran la calidad de vida del paciente.

5 La combinación de quimioterapia se puede reservar para recaídas de la enfermedad. La enfermedad intermedia y, especialmente, la enfermedad de alto grado es extremadamente agresiva y tiende a diseminarse. La enfermedad de este grado requiere tratamiento urgente. La radio terapia puede ser un componente útil del tratamiento en pacientes con enfermedad con mucha masa. Muchos regímenes

10 diferentes de quimioterapia se han empleado, y se puede obtener supervivencia de largo plazo libre de enfermedad en más de la mitad de los pacientes. La terapia de alta dosis con soporte de células madre fue introducida inicialmente a los pacientes con enfermedad recurrente o refractaria, pero está encontrando ahora crecientemente un lugar en la primera línea de terapia para los pacientes con

15 enfermedad de bajo riesgo. La tendencia en los años recientes a una aproximación terapéutica recientemente agresiva debe ser balanceada contra la generalmente mayor edad y debilidad relativa de muchos pacientes con NHL. Y por la necesidad de hacer coincidir la toxicidad del tratamiento con la prognosis individual de cada enfermedad del paciente.

20

Los tratamientos mejorados, que son más efectivos y mejor tolerados, son necesarios. Los agentes recientemente introducidos incluyen nuevas drogas citotóxicas, progresivamente incorporadas en combinaciones, y la introducción de terapias basadas en anticuerpos.

25

El linfoma no Hodgkin comprende un rango de linfomas de célula B. los antígenos de célula B por lo tanto representan objetivos adecuados para la terapia de anticuerpos.

30

El CD22 es una glicoproteína de membrana de 135 kDa que pertenece a una familia de proteínas que se unen a ácido siálico denominadas sialoadesinas. Se detecta en el citoplasma tempranamente en el desarrollo de las células B, aparece sobre la superficie celular simultáneamente con el IgD y se encuentra en la mayoría de las células B maduras. La expresión se incrementa luego de la activación de la

célula B. El CD22 se pierde con la diferenciación terminal y se reporta generalmente por estar ausente de las células de plasma. Así, el antígeno internalizante está presente sobre la superficie de las células pre-B y las células B maduras pero no las células madre o las células de plasma.

5

Las dos isoformas DC22 existen en el hombre. La forma predominante (CD22 β) contiene siete dominios similares a inmunoglobina (Ig-similar) en la región intracelular. Al variante CD22 α le falta el dominio 4 similar a Ig y puede tener un dominio citoplasmático truncado. Los anticuerpos que bloquean la adhesión de CD22 a los monocitos, neutrófilos, linfocitos y eritrocitos se han mostrado por unirse dentro del primer o segundo dominio similar a Ig.

10

El dominio citoplasmático del CD22 es tirosina fosforilada luego de la ligación del receptor de antígeno de célula B y se asocia con LyK, SyK y fosfatidil inositol 3-quinaza. La función del CD22 es submodular el umbral de activación de la célula B. Este también puede mediar la adhesión de la célula a través de la Interacción con células que llevan los sialoglicoconjugados apropiados.

15

El CD22 se expresa en la mayoría de las leucemias y linfomas de célula B, incluyendo NHL, leucemia linfoblástica aguda (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (B-CLL) y especialmente leucemia no linfocítica aguda (ANLL).

20

Los anticuerpos monoclonales contra CD22 han sido descritos en la técnica anterior. La WO 98/41641 describe anticuerpos anti-CD22 recombinantes con residuos de cisteína en V_H44 y V_L100. la WO 96/04925 describe las regiones V_H y V_L del anticuerpo anti-CD22 LL2. La US 5686072 describe combinaciones de Inmunotoxinas de anti-CD22 y anti-CD19. La WO 98/42378 describe el uso de anticuerpos anti-CD22 puros para el tratamiento de las malignidades de célula B.

25

Un número de terapias basadas en anticuerpo han sido recientemente licenciadas, por ejemplo Rituxan (un y1 humano quimérico no marcado (región +my1V) específica para CD20), o son ensayos clínicos para esta enfermedad. Estos confían en la muerte mediada por complemento o ADCC de las células por las células B o el uso de radio núcleos, tales como el ¹³¹I o ⁹⁰Y, que tienen problemas de

30

reparación y uso asociados para los médicos y los pacientes. Subsiste la necesidad de una molécula de anticuerpo para tratar el NHL que puede ser utilizada efectivamente y producida fácilmente y eficientemente. Subsiste también la necesidad de una molécula de anticuerpo, que tenga alta afinidad por el CD22 y baja Inmunogenicidad en humanos.

Resumen de la Invención

En un primer aspecto, la presente invención suministra una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 humano, que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende un CDR (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 1) para CDR-H1, como H2 en la figura 1 (ID de Sec. No.: 2) o un H2 del cual se ha removido el sitio de glicosilación potencial, o un H2 en el cual el residuo de lisina en la posición 60 (d acuerdo al sistema de enumeración Kabat) se ha reemplazado por un aminoácido alternativo, o un H2 en el cual tanto el sitio de glicosilación como la lisina reactiva en la posición 60 se ha removido con CDR -H2 o como H3 en la figura 1 (ID de Sec. No.:3) para CDR-H3.

La molécula de anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprenden al menos un CDR seleccionado de H1, H2 y H3 (ID de Sec. No.: 1, ID de Sec. No.: 2 y ID de Sec. No.: 3) para el dominio variable de cadena pesada. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos o más preferiblemente todos los tres ACDR en el dominio variable de la cadena pesada.

25

En un segundo aspecto de la presente invención, se suministra una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 humano, que comprende una cadena ligera en donde el dominio de variable comprende un CDR (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 4) para CDR-L1, L2 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 5) para CDR-L2 o L3 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 6) para CDR-L3.

30

La molécula de anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende al menos un CDR seleccionado de L1, L2 y L3 (ID de Sec. No.: 4); ID de

~~100~~
106

Sec. No.: 5 y ID de Sec. No.: 6) para el dominio variable de cadena ligera. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos y más preferiblemente todos los tres CDR en el dominio variable de la cadena ligera.

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

10 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo del primer o segundo aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada en donde el dominio de variable comprende un CDR (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 1) para CDR-H1, o H2 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 2) o un H2 del cual se ha removido el sitio de glicosilación potencial, o un H2, en el cual el residuo de lisina en la posición 60 (de acuerdo al sistema de
15 enumeración Kavut) se ha reemplazado por un aminoácido alternativo, o un H2 en el cual tanto el sitio de glicosilación como la lisina reactiva en la posición 60 se ha removido por CDR-H2 o como H3 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 3) para CDR-H3 en la cadena ligera en donde el dominio de variable comprende un CDR (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1
20 (ID de Sec. No.: 4) por CDR-L1, como L2 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 5) por CDR-L2 o como L3 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 6) por CDR-L3.

Los CDR dados en la ID de Sec. No.: 1 a 6 y en la Figura 1 mencionada anteriormente son derivados de un anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

25

Las secuencias completas de los dominios de variable del anticuerpo de ratón 5/44 son mostrados en la figura 2 (cadena ligera) (ID de Sec. No.: 7) y figura 3 (cadena pesada) (ID de Sec. No.: 8). Este anticuerpo de ratón también se denomina en lo sucesivo como "el anticuerpo donador" o el "anticuerpo monoclonal de murino".

30

Una primer modalidad alternativamente preferida del primer y segundo aspecto de la presente invención es el anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 que tiene las secuencias de dominio de variable de cadena ligera y pesadas mostradas en la figura 2 (ID de Sec. No.: 7) y la Figura 3 (ID de Sec. No.: 8), respectivamente. La

región constante de cadena ligera de 5/44 es kappa y la región constante de cadena pesada es IgG1.

En una segunda modalidad alternativamente preferida, del anticuerpo de acuerdo al primero y segundo aspecto de la presente invención es una molécula de anticuerpo de ratón/humano quimérico, denominada aquí como molécula de anticuerpo quimérico 5/44. La molécula de anticuerpo quimérico comprende los dominios de variable del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (ID de Sec. No.: 7 Y 8) y los dominios constantes humanos. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo 5/44 quimérico comprende el dominio C kappa humano (Hleter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; número de acceso al Genbank J00241) en la cadena ligera y los dominios gama 4 humanos (Flanagan *et al.*, Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada, opcionalmente con el residuo de serina en la posición 241 reemplazado por un residuo de prolina.

15

Preferiblemente, el anticuerpo de a presente invención comprende una cadena pesada en donde el dominio de variable comprende un CDR-H2 (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) como H2' en el cual una secuencia del sitio de glicosilación potencial se ha removido y que inesperadamente incrementó la afinidad del anticuerpo 5/44 quimérico para el antígeno CD22 y que preferiblemente tiene con el CDR-H2 la secuencia dada como H2' (ID de Sec. No.: 13).

20

Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio de variable comprende como CDR-H2 (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) un H2' en el cual el residuo de la posición 60, que está localizado en una posición expuesta dentro del CDR-H2 y que se considera que tiene el potencial para reaccionar con los agentes de conjugación que dan como resultado una reducción de la afinidad de unión del antígeno, es sustituida por un aminoácido alternativo para dar como resultado una sustitución conservada. Preferiblemente el CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2" (ID de Sec. No.: 15).

25

30

Alternativa o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio de variable comprende como



CDR-H2 (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) un H2^{'''} en el cual tanto la secuencia del sitio de glicosilación potencial y el residuo de lisina en la posición 60, son sustituidos por aminoácidos alternativos. Preferiblemente el CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2^{'''} (ID de Sec. No.: 16).

5

En una tercera modalidad alternativamente preferida, el anticuerpo de acuerdo a cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención es una molécula de anticuerpo insertado con CDR. El término "una molécula de anticuerpo insertado con CDR" como se utiliza aquí se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la

10 cadena pesada y/o ligera contiene uno o más CDR, (Incluyendo, si se desea, un CDR modificado) de un anticuerpo donador (un anticuerpo monoclonal de murino) injertado en una estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptador (un anticuerpo humano).

15

Preferiblemente, tal anticuerpo injertado con CDR tiene un dominio de variable que comprende regiones de estructura aceptadoras humanas así como también uno o más CDR donadores mencionados anteriormente.

20

25

30

Cuando los CDR son injertados, cualquier secuencia de estructura de región variable aceptadora apropiada se puede utilizar que tenga relación con la clase/tipo del anticuerpo donador del cual se derivan los CDR, incluyendo regiones de estructura de ratón, primate y humano. Los ejemplos de las estructuras de humano que se pueden utilizar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY Y POM (Kabat *et al.*, (*supra*)). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la cadena pesada, el RI se puede utilizar para la cadena ligera y el EU, LAY y POM se pueden utilizar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias de línea germinal humana. La región de estructura preferida para la cadena ligera es la secuencia del subgrupo germinal humano (DPK9+JK1) mostrado en la figura 5 (ID de Sec. No.: 17). La región de

estructura preferida para cadena pesada es la secuencia del subgrupo humano (DP7+JH4) mostrado en la figura 6 (ID de Sec. No.: 21).

En un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, que prefiere utilizar como el anticuerpo aceptador uno que tenga cadenas que sean homologas

con las cadenas del anticuerpo donador. Las cadenas pesada y ligera aceptadora no necesariamente necesitan ser derivadas del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas de compuesto que tengan regiones de estructura derivadas de cadenas diferentes.

5

También, en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, las regiones de estructura no necesitan exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptador. Por ejemplo, los residuos inusuales se pueden cambiar a residuos de ocurrencia más frecuente para aquella clase o tipo de cadena aceptadora. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones de estructura aceptadora se pueden cambiar de tal forma que ellos correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador o en un residuo que sea una sustitución conservadora para el residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador. Tales cambios se deben mantener en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones de estructuras aceptadoras que pueden necesitar ser cambiados se establece en la WO 91/09967.

Preferiblemente, en la molécula de anticuerpo injertada con CDR de acuerdo con la presente invención, si la cadena ligera aceptadora tiene la secuencia DPK9+JK1 del subgrupo humano (mostrado en la Figura 2) (ID de Sec. No.: 17) entonces las regiones de la estructura aceptadora de la cadena ligera comprenden residuos de donador en las posiciones 2, 4 37, 38, 45 y 60 y pueden comprender adicionalmente un residuo donador en la posición 13 (de acuerdo al Kabat *et al. (supra)*).

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada aceptadora tiene una secuencia DP7+J4 humana (mostrada en la figura 3) (ID de Sec. No.:21), entonces las regiones de estructura aceptadora de la cadena pesada comprenden, además de uno o más donadores CDR, los residuos donadores en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93 y pueden comprender adicionalmente residuos donadores en las posiciones 67 y 69 (de acuerdo a Kabat *et al. (supra)*).

112

Los residuos donadores son residuos provenientes del anticuerpo donador, es decir, el anticuerpo del cual fueron originalmente derivados los CDR.

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende una
5 cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se
definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) un H2' en el cual una secuencia de sitio de
glicosilación potencial se ha removido con el fin de incrementar la afinidad del
anticuerpo 5/44 quimérico para el antígeno CD22 y que preferiblemente tiene como
CDER-H2 la secuencia dada como H2' (ID de Sec. No.: 13).

10

Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención
puede comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende
como CDR-H2 (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) un H2'' en el cual un
residuo de lisina en la posición 60, que está localizada en una posición expuesta
15 dentro del CDR-H2 y que se considera que tiene el potencial de reaccionar con los
agentes de conjugación que dan como resultado la reducción de la afinidad de unión
del antígeno, es sustituida por un aminoácido alternativo. Preferiblemente el CDR-H2
tiene la secuencia dada como H2'' (ID de Sec. No.: 15).

20

Alternativa o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede
comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como
CDR-H2 (como se definió por Kabat *et al.*, (*supra*)) un H2''' en el cual tanto la
secuencia del sitio de glicosilación potencial como el residuo de lisina en la posición
60, son sustituidos por aminoácidos alternativos. Preferiblemente el CDR-H2 tiene la
25 secuencia dada como H2''' (ID de Sec. No.: 16).

30

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una
molécula de anticuerpo completa, que tenga unas cadenas pesada y ligera de
longitud completa; una estructura de esta, tal como un Fab, Fab modificado, Fab'
F(ab')₂ o un fragmento Fv; un monómero o dímero de cadena ligera o cadena
pesada; un anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo un Fv de cadena sencilla en
el cual los dominios de variable de cadena pesada y ligera están unidos a un ligador
péptido. Similarmente, las regiones variables de cadena pesada y ligera se pueden
combinar con otros dominios de anticuerpo según sea adecuado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener una molécula efectora o una reportera unida a esta. Por ejemplo, esta puede tener un macrociclo, para quelar un átomo de metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida a esta por una estructura de puente covalente. Alternativamente, los procedimientos de la tecnología de ADN recombinante se pueden utilizar para producir una molécula de anticuerpo en la cual el fragmento Fc (CH2, CH3 y los dominios de pivoteo), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa se han reemplazado por, o se han unido a este mediante enlaces de péptido, una proteína de no inmunoglobulina funcional, tal como una molécula de enzima o toxina.

La molécula de anticuerpo de la presente invención preferiblemente tiene una afinidad de unión de al menos $0,85 \times 10^{-10}$ M, más preferiblemente al menos $0,75 \times 10^{-10}$ M y más preferiblemente al menos $0,5 \times 10^{-10}$ M.

Preferiblemente la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable de cadena ligera 5/44-gL1 (ID de Sec. No.: 19) y el dominio de variable de cadena pesada 5/44-gH7 (ID de Sec. No.: 27). Las secuencias de los dominios variables de esta cadena pesada y ligera son mostradas en las figuras 5 y 6, respectivamente.

La presente invención también se relaciona con variantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada para CD22. Tales variantes se pueden obtener mediante un número de protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutar los CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), traqueteo de cadena (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de sepas mutadoras de E. Coli (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), traqueteo de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), despliegue de fago (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996), y PCR sexual (Cramerl *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

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

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

10 La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido mediante procesamiento químico, cADN,, ADN genómico y cualquier combinación de estos.

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

20 Los métodos generales por medio de los cuales son contruidos los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por aquellos 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 el manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

25 Las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener mediante un método bien conocido por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o todas las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo pueden ser sintetizadas según se desee de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácido.

30 La codificación de ADN para la secuencia de estructura aceptadora está ampliamente disponible para aquellos expertos en la técnica y puede ser fácilmente sintetizada sobre la base de subsecuencias de aminoácidos conocidas.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden utilizar para preparar secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótido. Las técnicas de reacción en cadena de mutagénesis y polimerasa dirigidas a sitio (PCR) se pueden utilizar según sea apropiado.

Cualquier sistema de célula/vector huésped adecuado se puede utilizar para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula del anticuerpo de la presente invención. Los sistemas bacteriales, por ejemplo *E. Coli*, y otros sistemas microbianos se pueden utilizar, en parte para la expresión de los fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente los fragmentos Fv y los fragmentos de anticuerpo de cadena simple por ejemplo, los Fv de cadena simple. Los sistemas de expresión de célula huésped eucariótica, por ejemplo, mamíferos se puede utilizar para la producción de moléculas de anticuerpos mayores, que incluyen moléculas de anticuerpos completas. Las células huésped de mamíferos adecuadas incluyen CHO, mieloma o células de hibridoma.

La presente invención también suministra un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para conducir a la expresión de la proteína de un ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

25

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solamente una secuencia de codificación de polipéptido de cadena pesada o cadena ligera necesita ser utilizado para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesada como ligera, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un vector simple, el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

30



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.

5

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

10

La molécula de anticuerpo puede ser el ingrediente activo solo en la composición terapéutica o diagnóstico o se puede acompañar por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo célula anti-T, anticuerpos anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpo tal como xantinas.

15

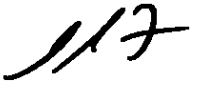
Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se utiliza aquí se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesitado de tratar, mejorar o evitar una enfermedad o condición objetivo, o exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo de células o en modelos de animal, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal también se puede utilizar para determinar el rango de concentración apropiado y la ruta de administración. Tal información se puede utilizar para determinar las dosis y las rutas útiles para la administración en humanos.

20

25

30

La cantidad efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación o combinaciones de droga, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico. De manera general, una dosis efectiva será desde



0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg.

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

10 La dosis e la cual la molécula de anticuerpo de la presente invención se administra depende d la naturaleza de la condición a ser tratada, el grado del linfoma maligno o leucemia y si la molécula de anticuerpo está siendo utilizada profilácticamente o para tratar una condición existente.

15 La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y la duración de su efecto. Si la molécula d anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo 2 a 10 horas) será 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) puede ser solo necesario dar una dosis por día, una vez por semana o aún una vez cada uno o dos meses.

20 Una composición farmacéutica también contiene un portador farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El portador no debe en sí mismo inducir la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la composición y no debe ser tóxica. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, 25 aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y partículas de virus inactivas.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como clorhidratos, bromohidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden adicionalmente contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares, tales como los agentes de humedecimiento o emulsificantes o las sustancias amortiguadoras de Ph, pueden

118

estar presentes en tales composiciones. Tales portadores le posibilitan a las composiciones farmacéuticas ser formuladas como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, melazas, lechadas y suspensiones, para la ingestión por el paciente.

5

Las formas preferidas de administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección e infusión, este puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes formulatorios, tales como agentes de suspensión, preservación, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede ser o estar en forma seca, para reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

15 Una vez formulada, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones sean adaptadas para administración a sujetos humanos.

20 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante un número de rutas que incluyen, pero no están limitadas a, rutas orales, intravenosas, intramusculares, intra-arteriales, intramedulares, Intratecales, intraventriculares, transdérmicas, transcutáneas (por ejemplo, ver WO 98/20734), subcutáneas, Intrapéritoneales, Intranasales, entéricas, tópicas, sublinguales, 25 intravaginales o rectales. Los hiporciadores también se pueden utilizar para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, la composición terapéutica se puede preparar como inyectables, bien sea en soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar.

30

El suministro directo de las composiciones generalmente se logrará mediante la inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o suministrada al espacio intersticial de un tejido. Las

119

composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un programa de dosis simple o un programa de dosis múltiple.

5 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, este será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si la composición va a ser administrada mediante una ruta que utiliza el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan el anticuerpo de la degradación pero que liberen e anticuerpo una vez se ha absorbido por el tracto gastrointestinal.

10

Una discusión completa de los portadores farmacéuticamente aceptables se encuentra disponible en Remington Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, N. J. 1991).

15

También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se administrará mediante el uso de una terapia génica. Con el fin de lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes de ADN apropiados son introducidos dentro del paciente de tal forma que las cadenas de anticuerpo son expresadas de las secuencias de ADN y ensambladas *in situ*.

20

La presente invención también suministra la molécula del anticuerpo de la presente invención para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por células que expresan CD22.

25

La presente invención suministra además el uso de la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por células que expresan CD22.

30

La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia donde se desee reducir los niveles de células que expresan CD22 que están presentes en el cuerpo humano o animal. Estas células que expresan CD22 pueden ser circulantes en e cuerpo están presentes en unos niveles indeseablemente altos localizados en un sitio particular del cuerpo. Por ejemplo,

posniveles elevados de células que expresan CD22 estarán presentes en linfomas de células B y leucemia. La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en la terapia de enfermedades mediadas por células que expresan CD22.

5

La molécula de anticuerpo de la presente invención es preferiblemente utilizada para el tratamiento de linfomas malignos y leucemias, más preferiblemente NHL.

10

La presente invención también suministra un método para tratar sujetos humanos o animales que sufren o tienen riesgo de un desorden mediado por células que expresan CD22, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

15

La molécula de anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en diagnóstico, por ejemplo el diagnóstico *in vivo* y las imágenes de estado de enfermedad que involucran células que expresan CD22.

20

La presente invención es adicionalmente descrita por vía solo de ilustración en los siguientes ejemplos, que se refieren a las figuras que la acompañan, en las cuales:

25

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácido de los CDR del anticuerpo monoclonal del ratón 5/44 (ID de Sec. No.: 1 A 6);

La figura 2 muestra la secuencia completa del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal del ratón 5/44;

30

La figura 3 muestra la secuencia completa del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal del ratón 5/44;

La figura 4 muestra la estrategia para la remoción del sitio de glicosilación y la lisina reactiva en CDR-H2;

121

La figura 5 muestra el diseño de injerto para la secuencia de cadena ligera 5/44;

La figura 6 muestra el diseño de injerto para la secuencia de cadena pesada 5/44;

5

La figura 7 muestra los vectores pMRR14 y pMRR10.1;

La figura 8 muestra unos resultados de ensayo Biacore de los mutantes 5/44 quiméricos;

10

La figura 9 muestra los oligonucleótidos para los ensamblajes de gen gH1 y gL1 5/44;

La figura 10 muestra los vectores intermedios pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1);

15

La figura 11 muestra los cassettes de oligonucleótidos utilizados para hacer injertos adicionales;

20

La figura 12 muestra el ensayo de competición entre anticuerpos 5/44 de ratón fluorescentemente marcado y las variantes injertadas; y

La figura 13 muestra la secuencia de ADN y de proteínas completas de las cadenas pesada y ligera injertadas.

25

Descripción Detallada de la Invención

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos candidatos

30

Un panel de anticuerpos contra CD22 fueron seleccionados de hibridomas que utilizan los siguientes criterios de selección: unión a células Daudi, internacionalización sobre células Daudi, unión a células mononucleares de sangre periférica (PBMC), internacionalización de PBMC, afinidad (mayor de 10^{-9} M), y1 de ratón e índice de producción. El 5/44 fue seleccionado como el anticuerpo preferido.

Ejemplo 2: Clonación de Gen y Expresión de una Molécula de Anticuerpo 5/44
Química.

5 Preparación de las Células de Hibridoma 5/44 y Preparación de ARN de este

El hibridoma 5/44 fue generado mediante tecnología de hibridoma convencional luego de la inmunización de ratones con proteínas CD22 de humano. El ARN se preparó de células de hibridoma 5/44 utilizando un kit RNEasy (Qiagen, 10 Crawley, UK; Catalogo No. 74106). El ARN obtenido fue transcrito Inverso al cADN, como se describe adelante.

Distribución de CD22 Sobre Tumores NHL.

15 Un estudio de inmunohistoquímica fue tomado para examinar la incidencia y distribución del tejido utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD22 5/44. Se incluyeron anticuerpos anti-CD20 y anti-CD79a de control en el estudio para confirmar las áreas de de las células B de los tumores.

20 Un total de 50 tumores fueron estudiados y estos fueron categorizados como sigue al utilizar la formulación de trabajo y los sistemas de clasificación REAL:

- 7 leucemia/linfoma linfoblástico B (Alto/I)
- 4 linfoma linfocítico B-CLL/pequeño (Bajo/A)
- 25 • 3 inmunocitoma linfoplasmacitoide (Bajo/A)
- 1 célula mantle (Int/F)
- 14 linfomas del centro de folículo (Bajo a Int/D)
- 13 linfoma de célula grande difuso (Int a Alto/G, H)
- 6 no clasificables (K)
- 30 • 2 linfomas de célula T

40 linfomas de célula B fueron positivos para el antígeno CD22 con el anticuerpo 5/44 a 0,1 µg/ml y 6 adicionales se volvieron positivos cuando la concentración se incrementó a 0,5 µg/ml. Para los restantes 2 tumores de célula B

que fueron negativos a 0,1 µg/ml, hubo insuficiente tejido restante para ensayar a mayor concentración. Sin embargo, el ensayo paralelo con otro anticuerpo anti-CD22 Celltech 6/13, que dio mayor tñido que el 5/44, resultó en todos los 48 linfomas de células B tñiendo positivo para CD22.

5

Así, es posible concluir que el antígeno de CD22 está ampliamente expresado en los linfomas de célula B y suministra así un objetivo adecuado para la inmunoterapia en NHL.

10 Clonación PCR de V_H 5/44 y V_L.

Las secuencias de cADN que codifican para los dominios de variable de las cadenas pesada y ligera 5/44 fueron sintetizadas utilizando transcriptasa Inversa para producir copias de cADN de hebra simple del mRNA presente en el ARN total.

15 Este fue entonces utilizado como un molde para la amplificación de las secuencias de región de de murino utilizando iniciadores de oligonucleótido específicos mediante la reacción de cadena de polimeraza (PCR).

a) Síntesis de cADN

20

El cADN fue sintetizado en un volumen de reacción de 20 µl que contiene los siguientes reactivos: 50mM de Tris-HCL pH 8.3, 75 mM de KCL, 10 mM de diltreitol 3 mM de MgCL₂, 0,5 mM de cada deoxiribonucleosido trifosfato, 20 unidades de RANsin 75 ng de Iniciador de hexanucleótido aleatorio, 2 µg de ARN 5/44 y 200 unidades de transcriptasa inversa de virus de leucemia de Murino Moloney. Después de la incubación a 42°C durante 60 minutos, la reacción se terminó al calentar a 95°C durante 5 minutos.

25

b) PCR

30

Las alíquotas del cADN fueron sometidas a PCR utilizando combinaciones de iniciadores específicos para las cadenas pesada y ligera. Grupos de iniciadores degenerados designados para recombinar hebras con secuencias conservadas del péptido de de señal fueron utilizadas como iniciadores adelantados. Estas

124

secuencias contendrán todas como en orden, un sitio de restricción (V_L SfuI; V_H HindI) iniciando 7 nucleótidos desde su extremo 5', la secuencia GCCGCCACC (ID de Sec. No.: 50), para permitir la traducción óptima de los mRNA resultante, un codon de iniciación y 20-30 nucleótidos basados en las secuencias de péptido líder de los anticuerpos de ratón conocidos (Kabat et al; Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Los iniciadores 3' son designados para abrazar la unión 4 J-C de la estructura del anticuerpo y contener un sitio de restricción para la enzima BsiWI para facilitar la clonación del fragmento PCR V_L . Los iniciadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abrazar la Unión J-C del anticuerpo. El iniciador 3' incluye un sitio de restricción ApaI para facilitar la clonación. La región 3' de los iniciadores contiene una secuencia mezclada basada en aquellas encontradas en anticuerpos de ratón conocidos (Kabat et al, 1991, *supra*).

Las combinaciones de los iniciadores descritos anteriormente le posibilitan a los productos PCR para V_H y V_L ser clonados directamente en un vector de expresión apropiado (ver adelante) para producir cadenas pesada y ligera quiméricas (ratón-humano) y para estos genes ser expresados en células de mamífero para producir anticuerpos quiméricos del isotipo deseado.

Las incubaciones (100 μ l) para los PCR fueron configuradas como sigue. Cada reacción contenía 10 mM de Tris-CHL Ph 8.3, 1.5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCL, 0.01% p/v de gelatina, 0,25 mM de cada deoxiribonucleosido trifosfato, 10 pmoles de mezcla del iniciador 5', 10 pmoles de iniciador 3', 1 μ l de cADN y una unidad de polimeraza Taq. Las reacciones fueron incubadas a 95°C durante 5 minutos y luego cicladas a través de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, las alícuotas de cada reacción fueron analizadas mediante electroforesis sobre un gel de agarosa.

Para la región V de cadena pesada,, el producto de ADN amplificado se obtuvo solamente cuando el primer grupo que recombina hebras dentro del inicio de

la estructura 1 reemplazo el grupo iniciador del péptido de señal. Los fragmentos fueron clonados en vectores de secuenciación de ADN. La secuencia de ADN se determinó se tradujo para dar una secuencia de aminoácido deducida. Esta secuencia deducida se verificó mediante la eferencia con la secuencia de proteína N-terminal determinada experimentalmente. Las Figuras 2 y 3 muestran la secuencia de ADN/proteína de las regiones V de cadena ligera y pesada del 5/44 monoclonal de ratón respectivamente.

c) Clonación Molecular de los Fragmentos PCR

10

La secuencia de la región V de murino fueron entonces clonadas en los vectores de expresión pMRR10.1 y pMRR14 (Figura 7). Estos son vectores para la expresión de cadena ligera y pesada respectivamente que contiene ADN que codifica regiones constantes de cadena ligera capa de humano y cadena pesada gama-4 de humano. La región V_L fue subclonada en el vector de expresión mediante digestión de restricción y ligado del vector de secuenciación, utilizando sitios de restricción SFUL y BsiWI, creando plasmado Pmr10(544cl). El ADN de cadena pesada se amplificó mediante PCR utilizando un iniciador 5' para inducir un péptido de señal, en razón a que este no fue obtenido en la estrategia de clonación-fue empleado un líder anticuerpo de cadena pesada de ratón de un hibridoma interno diferente (denominado 162). El iniciador 5' tenía las siguientes secuencias:

20

25

GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCTGGCA
CTCATTCTCAAGGGAGTGAGGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG^{3'} (ID de
Sec. No.: 51).

30

El iniciador inverso se identificó como aquel utilizado en la clonación de gen V_H original. El producto PCR resultante se digirió con enzimas HindIII y ApaI, fue subclonado, y su secuencia de ADN se confirmó, quedando el plasmado pMRR14(544cH). La cotransfección transitoria de ambos vectores de expresión en el anticuerpo c5/44 quimérico generado por células CHO. Esto se logró utilizando un reactivo Lipofectamine de acuerdo con los protocolos del fabricante (In Vitrogen: Life Technology, Groningen, The Netherlands. Catalogo no. 11668-027).

Remoción del Sitio de Glicosilación y la Lisina Reactiva

Se observó una secuencia de sitio de glicosilación ligada a N potencial en CDR-H2, que tiene la secuencia de aminoácido N-Y-T (Figura 3). El SDS-PAGE, la transferencia de Western y el tefido de carbohidrato de geles de 5/44 y sus fragmentos (incluyendo Fab) indicaron que este sitio era de hecho glicosilado (no mostrado). Además, un residuo de lisina se observó en una posición expuesta dentro del CDR-H2, que tenía el potencial de reducir la afinidad de unión del anticuerpo al suministrar un sitio adicional para la conjugación con un agente con el cual el anticuerpo podía ser conjugado.

Una estrategia PCR se utilizó para introducir sustituciones de aminoácido en la secuencia de CDR-H2 en un intento por remover el sitio de glicosilación y/o la lisina reactiva como se mostró en la figura 4. Los iniciadores de adelanto que codifican las mutaciones N55Q, T57A o T57V fueron utilizados para remover el sitio de glicosilación (Figura 4) y un cuarto iniciador de adelanto que contenía la sustitución K60R, se generó para remover el residuo de lisina reactivo (Figura 4). Un iniciador inverso 4 de estructura se utilizó en cada una de estas amplificaciones PCR. Los productos PCR fueron digeridos con las enzimas xBai Y Apa1 y fueron insertados en el pMRR14(544cH) (también clivado con XbaI y ApaI) para generar plasmados de expresión que codifican estos mutantes. Las mutaciones N55Q, T57A y T57V extirparon el sitio de glicosilación al cambiar la secuencia de aminoácido del consenso N-X-T/S mientras la mutación K60R reemplaza la lisina potencialmente reactiva con arginina de residuo cargada de manera similar positivamente. Los plasmados variantes cH resultantes fueron co-transfectados con el plasmido cL para generar variantes de anticuerpo quimérico expresados.

Evaluación de las Actividades de los Genes Quiméricos

Las actividades de los genes quiméricos fueron evaluadas luego de transfección transitoria en células CHO.

c) Determinación de las Constantes de Afinidad mediante BiaCore Análisis.

Las afinidades de 5/44 quimérico o subvariantes, que hablan tenido su sitio de glicosilación o su lisina reactiva removida, fueron ingeridas utilizando tecnología BIA para unirse a las construcciones CD22-mFc. Los resultados son mostrados en la figura 8. Todas las mediciones de unión fueron desarrolladas en un instrumento BIAcore™ 2000 (Farmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo fue desarrollado al capturar el CD22mFc por vía del anti ratón Fc Inmovilizado. El anticuerpo estuvo en fase soluble. Las muestras, estándar y controles (50ul) fueron inyectadas sobre Fc de anti-ratón Inmovilizado luego seguido por anticuerpo en fase soluble. Después de cada ciclo la superficie se regeneró con 50ul de 40mM de HCL a 30ul/min. El análisis cinético se desarrolló utilizando el soporte lógico BIAevaluation 3.1 (Farmacia).

La remoción del sitio de glicosilación en la construcción T57A dio como resultado una proporción ligeramente más rápida y una significativamente inferior desproporción, comparada con el 5/44 quimérico, dando una mejora de afinidad de aproximadamente 5 veces. La mutación N55Q no tuvo efecto en la afinidad. Este resultado fue inesperado en razón a que sugiere que la remoción del carbohidrato mismo aparentemente no tiene efecto sobre la unión (como con el cambio N55Q). La afinidad mejorada se observó solamente con el cambio T57A. Una explicación posible es que, sin importar la presencia del carbohidrato, la treonina en la posición 57 ejerce un efecto negativo en la unión que es removida sobre la conversión de la treonina a alanina. La hipótesis de que el tamaño pequeño de la alanina es importante, y que el efecto negativo de la treonina está relacionado con su tamaño, está soportado en el resultado obtenido utilizando la mutación 357V: ese reemplazo con valina en la posición 57 no es benéfico (resultados no mostrados).

La remoción de la lisina por la mutación K60R tenía un efecto neutral sobre la afinidad, es decir la introducción de la arginina remueve un sitio reactivo potencial sin comprometer la afinidad.

Las mutaciones para la remoción del sitio de glicosilación y la remoción de la lisina reactiva fueron por lo tanto ambas incluidas en el diseño de humanización.

Ejemplo 2: Injerto CDR de 5/44

La clonación molecular de genes para las regiones variables de cadenas pesada y ligera de anticuerpo 5/44 y su uso para producir anticuerpos quiméricos (ratón/humano) 5/44 habían sido descritas anteriormente. La secuencia de nucleótidos y aminoácido de los dominios V_L y V_H del 5/44 de ratón son mostrados en las Figuras 2 y 3 (ID de Sec. No.: 7 y 8), respectivamente. Este ejemplo describe un Injerto de CDR del anticuerpo 5/44 sobre estructuras humanas para reducir la inmunogenicidad potencial en humanos, de acuerdo con el método de Adair et al., (WO91/09967).

Injerto CDR de Cadena Ligera de 5/44

El alineamiento de la secuencia de proteína con las secuencias de consenso de la región V de cadena ligera kappa subgrupo 1 de humanos indicó 64% de identidad. Consecuentemente, para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones de estructura aceptadora escogidas correspondían a aquellas de la secuencia 012, DPK9 de la línea germinal del subgrupo 1 VK de humano. La secuencia aceptadora de la estructura 4 se derivó de la secuencia de línea germinal de región J de humano JK1.

Una comparación de las secuencias de aminoácido de las regiones de estructura del 5/44 de murino y la secuencia aceptadora es dada en la Figura 5 y muestra que existen 27 diferencias entre las cadenas donadora y aceptadora. En cada posición se hizo el análisis del potencial del residuo de murino para contribuir a la unión del antígeno, directa o indirectamente, a través de los efectos sobre el empaque o en la interfase de V_H/V_L . Si un residuo de murino se consideró importante y suficientemente diferente del residuo de humano en términos de tamaño, la polaridad y la carga, entonces fue retenido aquel residuo de murino. Con base en este análisis, dos versiones de la cadena ligera injertada con CDR, que tiene las secuencias dadas en la ID de Sec. No.: 19 y la ID de Sec. No.: 20 (Figura 5), fueron construidas.

Injerto de CDR de Cadena Pesada de 5/44

El injerto de CDR de la cadena pesada de 5/44 se logró utilizando la misma estrategia que se describió para la cadena ligera. El dominio V de la cadena pesada de 5/44 se encontró que era homóloga a las cadenas pesadas humanas que pertenecían al subgrupo I (70% de identidad de secuencia) y por lo tanto la secuencia de la estructura VHI-3, DP7 de la línea germinal del subgrupo 1 de humano se utilizó como una estructura aceptadora. Las secuencias del aceptador de la estructura 4 fueron derivadas de la secuencia JH4 de la línea germinal de la región J de humano.

10

Una comparación de la cadena pesada de 5/44 con las regiones de estructura se muestra en la figura 6 donde se puede ver que la cadena pesada de 5/44 difiere de la secuencia aceptadora en 22 posiciones. El análisis de la contribución que cualquiera de estas podría hacerle a la unión del antígeno le permitió a 5 versiones de las cadenas pesadas injertadas con CDR ser construidas, teniendo las secuencias dadas en la ID de Sec. No.: 23, ID de Sec. No.: 24, ID de Sec. No.: 25, ID de Sec. No.: 26 y ID de Sec. No.: 27 (Figura 6).

15

Construcción de los Genes para Secuencias Injertadas

20

Los genes fueron diseñados para codificar las secuencias injertadas gH1 Y gL1, y unas series de oligonucleótidos traslapantes fueron diseñados y construidos (Figura 9). Una técnica de montaje PCR se empleó para construir los genes de región V injertados con CDR. Los volúmenes de reacción de 100 μ l fueron configurados conteniendo 10 mM de Tris-HCL Ph 8.3, 1.5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCL, 0,001% de gelatina, 0,25 mM de cada deoxiribonucleosido trifosfato, 1 pmol de cada uno de los iniciadores "interno" (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmol de cada uno de los iniciadores "externo" (F1, R1), y una unidad de polimeraza Taq (AmpliTaq, Applied BioSystems, Catalogo no. N808-0171). Los parámetros del ciclo PCR fueron 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, durante 30 ciclos. Los productos de reacción fueron entonces procesados sobre un gel de agarosa a 1.5%, excisionados y recubiertos utilizando columnas de giro QIAGEN (QIAquick gel extraction kit, cat no. 28706). El ADN fue eluado en un volumen de 30 μ l. Las alícuotas (1 μ L) el gH1 y el ADN gL1 fueron entonces clonadas en el vector

25

30

pCR2.1 TOPO de clonación TOPO TA In Vitrogen (catalogo no. K4500-01) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este vector de expresión sirvió como un intermedio de clonación para facilitar la secuenciación de un gran número de clones. La secuenciación del ADN utilizando iniciadores específicos de vector fueron
5 utilizadas para identificar los clones correctos que contenían gH1 y GL1, creando plasmados pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1) (Figura 10).

Un método de reemplazo de cassette de oligonucleótidos se utilizó para crear los injertos humanizados gH4, 5, 6 y 7, y gL2. La Figura 11 muestra el diseño de los
10 cassettes de oligonucleotido. Para construir cada variante, el vector (pCR2.1 (544gH1) o pCR2.1 (544gL1)) se cortó con las enzimas de restricción mostradas (XmaI/SacII para la cadena pesada, XmaI/BstEII para la cadena ligera). El fragmento del vector grande fue gel purificada de agarosa y luego utilizada en la ligación con el
15 cassette de oligonucleotido. Estos cassettes están compuestos de dos oligonucleótidos complementarios (mostrados en la Figura 11), mezclados a una concentración de 0,5 pmoles/μl en un volumen de 200 μl 12,5 mM de tris-HCL Ph 7.5, 2.5 mM de MgCl₂, 25 mM de NaCl, 0.25 mM ditioneóritol. La recombinación de hebras se logró al calentar a 95°C durante 3 minutos en un baño de agua (volumen 500 ml) luego permitiendo que la reacción se enfriara lentamente hasta temperatura
20 ambiente de cuarto. El cassette de oligonucleotido con recombinado de hebra fue entonces diluido 10 veces en agua antes de la ligación en el vector apropiadamente cortado. La secuenciación de ADN se utilizó para confirmar la secuencia correcta, creando plasmados PCR.1 (5/44-gH4-7) y pCR2.1 (5/44-gL2). Las secuencias injertadas verificadas fueron entonces subclonadas en los vectores de expresión
25 pMRR14 (cadena pesada) y pMRR10.1 (cadena ligera).

La Actividad de Unión del CD22 de las Secuencias Injertadas con CDR.

Los vectores que codifican las variantes injertadas fueron cotransfectadas en
30 células CHO en una variedad de combinaciones, junto con las cadenas de anticuerpo quimérico original. La actividad de unión se comparó en un ensayo de competición, compitiendo la unión del anticuerpo 5/44 de ratón original por la unión a células Ramos (obtenidas del ATCC, una línea celular humana de linfoblasto de linfoma Burkitt que expresa CD22 en la superficie). Este ensayo se consideró la mejor

manera de comparar los injertos en su capacidad por unirse a la superficie celular CD22. Los resultados son mostrados en la figura 8. Como se puede ver, existe muy poca diferencia entre cualquiera de los injertos, todos desempeñándose más efectivamente que el quilmérico en competición contra el pariente de murino. La introducción de los tres residuos humanos adicionales en el extremo CDR-H3 (gH5 y gH7) no parece afectar la unión.

La combinación del injerto con el menor número de residuos de murino se seleccionó, gL1gH7. El injerto de cadena ligera gL1 tiene 6 residuos donadores. Los residuos V2, V4, L37 y Q45 son residuos de empaque potencialmente importantes. El residuo H38 está en la interfase V_H/V_L . El residuo D60 es un residuo de superficie cercano al CDR-L2 y puede contribuir directamente a la unión del antígeno. De estos residuos, el V2, L37, Q45 y D60 son encontrados en la secuencia de liga germinal de los genes de kappa humanos de otros subgrupos. El injerto de cadena pesada gH7 tiene 4 residuos de estructura donadora (residuo R28 se considera como parte del CDR-H1 bajo la definición estructural utilizada en el injerto CDR (se Adair et al (1991 WO91/09967))). Los residuos E1 y A71 son residuos de superficie cercanos a los CDR. El residuo 148 es un residuo de empaque potencial. El residuo T93 está presente en la interfase de V_H/V_L . De estos residuos, el E1 y el A71 se encuentran en otros genes de línea germinal del subgrupo 1 de humano. El residuo 148 se encuentra en un subgrupo 4 de línea germinal de humano, y el T73 se encuentra en el subgrupo 3 de línea germinal de humano.

El ADN completo y la secuencia de proteína tanto de cadena ligera como de cadena pesada, incluyendo la posición aproximada de los intrones dentro de los genes de región constante suministrados por los vectores, son mostrados en la figura 13 y son dados en ID de Sec. No.: 29 y ID de Sec. No.: 28 respectivamente para la cadena ligera y ID de Sec. No.: 31 y ID de Sec. No.: 30 respectivamente para la cadena pesada.

30

El ADN que codifica estos genes de cadena ligera y pesada fue extraído de estos vectores. El ADN de cadena pesada fue digerido en el sitio HindIII 5' luego fue tratado con el fragmento Klenow de polimeraza I de ADN de *E. Coli* para crear un extremo embotado 5'. El clivaje en el sitio EcoR1 3' dio como resultado el fragmento

de cadena pesada que fue purificado de los geles de agarosa. De la misma manera, el fragmento de cadena ligera fue producido, embotado en el sitio SfuI 5' y con un sitio EcoR1 3'. Ambos fragmentos fueron clonados en vectores de expresión basados en DHFR y utilizados para generar líneas de célula estables en células CHO.

133

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para CD22 de humano, que comprende una ~~cadena pesada en~~ donde el dominio de variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como H1 en la Figura 1, (ID de Sec. No.: 1) para CDR-H1, como H2 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 2) o H2' (ID de Sec. No.: 13) o H2" (ID de Sec. No.: 15) o H2''' (SEQ IS NO: 16) para CDR-H2 o como H3 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 3) para CDR-H3.
2. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para CD22 de humano, que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como L1 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 4) para CDR-L1 como L2 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 5) para CDR-L2 como L3 en la Figura 1 (ID de Sec. No.: 6) para CDR-L3.
3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende una ~~cadena pesada en~~ donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en el ID de Sec. No.: 1 para CDR-H1, ID de Sec. No.: 2 o ID de Sec. No.: 3 o ID de Sec. No.: 15 o ID de Sec. No.: 16 para CDR-H2 o ID de Sec. No.: 3 para CDR-H3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en el ID de Sec. No.: 4 para CDR-L1, ID de Sec. No.: 5 para CDR-L2 o ID de Sec. No.: 6 para CDR-L3.
4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende ID de Sec. No.: 1 para CDR-H1, ID de Sec. No.: 2 o ID de Sec. No.: 13 o ID de Sec. No.: 15 o ID de Sec. No.: 16 para CDR-H2, ID de Sec. No.: 3 para CDR-H3, ID de Sec. No.: 4 para CDR-L1, ID de Sec. No.: 5 para CDR-L2 y ID de Sec. No.: 6 para CDR-L3.

claim 3

134

5. La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una molécula de anticuerpo injerada con CDR.
6. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5 en donde el dominio de variable comprende regiones de estructura aceptadoras de humano y CDRJ donadores no humanos.
7. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6 en donde la región de estructuras aceptadoras de humano del dominio variable de la cadena pesada están basadas en la secuencia de consenso del subgrupo 1 de humano y comprende residuos donadores en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93 que corresponden a los residuos en aquellas posiciones de ID de Sec. No.: 8.
8. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente residuos de donador en las posiciones 67 y 69 que corresponden a los residuos en aquellas posiciones en el ID de Sec. No.: 8.
9. La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde las regiones de estructura del aceptador de humano del dominio de variable de cadena ligera están basadas en una secuencia de consenso del subgrupo 1 de humano y comprenden residuos donadores en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60 que corresponden a los residuos en aquellas posiciones en el ID de Sec. No.: 7.
10. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un residuo donador en la posición 3 que corresponde al residuo en esa posición en el ID de Sec. No.: 7.
11. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano, que comprende una cadena pesada de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, y una cadena ligera de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.

135

- 5
12. La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la región variable de cadena ligera 5/44-gL1 (ID de Sec. No.: 19) y la región variable de cadena pesada 5/44-gH7 (ID de Sec. No.: 27).
- 10
13. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano que comprende una cadena ligera, en donde la secuencia de la cadena ligera comprende la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 28.
14. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano, que comprende una cadena ligera, en donde la secuencia de la cadena ligera consiste de la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 28.
- 15
15. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano, que comprende una cadena pesada, en donde la secuencia de la cadena pesada comprende la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 30.
- 20
16. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano que comprende una cadena pesada, en donde la secuencia de la cadena pesada consiste de la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 30.
- 25
17. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 28 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 30.
- 30
18. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el CD22 de humano, que tiene una cadena ligera que consiste de la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 28 y una cadena pesada que consiste de la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 30.
19. Una variante de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que tiene una afinidad mejorada por el CD22. da

136

20. La variante de la reivindicación 19 que se obtiene mediante un protocolo de maduración de afinidad.
- 5 21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo monoclonal anti-CD22 5/44, en donde el dominio variable de la cadena ligera tiene la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 7 y el dominio variable de la cadena pesada tiene la secuencia dada en el ID de Sec. No.: 8. *aka*
- 10 22. La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una molécula de anticuerpo quimérica que comprende las secuencias de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 21, citado en el ID de Sec. No.: 7 y ID de Sec. No.: 8 respectivamente. *=*
- 15 23. Una molécula de anticuerpo que comprende un CDR que comprende una secuencia CDR donadora troncada en donde la porción perdida del donador CDR es reemplazada por una secuencia diferente y forma un CDR funcional. *Janich*
- 20 24. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 23, en donde la parte faltante de la secuencia CDR es del anticuerpo del cual las regiones de estructura de la molécula de anticuerpo son derivadas. *da*
- 25 25. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 24, en donde la parte faltante de la secuencia de CDR se deriva de un anticuerpo de línea germinal que tiene regiones de estructura de consenso. *da*
- 30 26. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde el CDR-H2 de la cadena pesada es híbrido en la molécula de anticuerpo. *Sec*

132

27. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en donde el truncamiento de el CDR donador es de 1 a 8 aminoácidos.
- 5 28. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 27, en donde el truncamiento es de 4 a 6 aminoácidos.
28. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en donde el truncamiento es hecho en el terminal C del CDR.
- 10 30. Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de una molécula de anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
- 15 31. Un vector de clonación o expresión que comprende una secuencia de ADN de acuerdo a la reivindicación 30.
32. Una célula huésped que comprende un vector de clonación o expresión de acuerdo a la reivindicación 31.
- 20 33. Una molécula de anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o una secuencia de ADN de acuerdo a la reivindicación 30 para uso en terapia.
- 25 34. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o 33, que tiene especificidad por el CD22 de humano, o una secuencia de ADN de acuerdo a la reivindicación 30 para uso en el tratamiento de una patología mediada por células que expresan CD22.
- 30 35. Una molécula de anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 33 o reivindicación 34 o una secuencia de ADN de acuerdo a la reivindicación 33 o reivindicación 34, para uso en el tratamiento de linfoma maligno.

Clea

do

resultados

36. Una molécula de anticuerpo o secuencia de ADN de la reivindicación 35, en donde el linfoma maligno es un linfoma no Hodgkin.
- 5 37. Uso de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que tiene especificidad por el CD22 de humano, o el uso de una secuencia de ADN de acuerdo a la reivindicación 30 en la elaboración de un medicamento para tratar una patología mediada por células que expresan CD22.
- 10 38. El uso de la reivindicación 37, en donde la patología es un linfoma maligno.
- 15 39. La reivindicación 38, en donde el linfoma maligno es un linfoma no Hodgkin.
- 20 40. Una composición terapéutica o de diagnóstico que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o la secuencia de ADN de la reivindicación 30.
- 25 41. Una composición terapéutica o de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 40, que comprende un excipiente, diluyente o portador, farmacéuticamente aceptable.
- 30 42. Una composición terapéutica o de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 40 o reivindicación 41, que comprende adicionalmente célula anti-T; anti-IFN γ o anticuerpos anti-LPS, o ingredientes sin anticuerpo tales como xantinas.
43. Un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo a la reivindicación 32 bajo condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína del ADN que codifica dicha molécula de anticuerpo y aislar dicha molécula de anticuerpo.

di
cualq

139

44. Un proceso para la preparación de una composición terapéutica o de diagnóstico de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, que comprende mezclar una molécula de anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 junto con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

45. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido dada en una cualquiera de la ID de Sec. No.: 1 a 28 o ID de Sec. No.: 30.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicacion : 04120665 00000000 Folios: 1
 Fecha (MM): 2004-11-20 17:25:56
 Trámite : 011 PCT-POTENI 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVOS CRECIMIENTOS

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32758694	08/11/2004	55,446,000.00

***** C O N C E P T O *****

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

RESPONSABLE : *[Signature]*

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Go 1215-841-003

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
- 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:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04129665 00000000 Folios: 140
Fecha (HRS): 2004-11-20 17:25:35
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE INCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

192

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
EMILIO FERRERO
Apoderado
CELLTECH R & D LIMITED

Oficio N°
11574

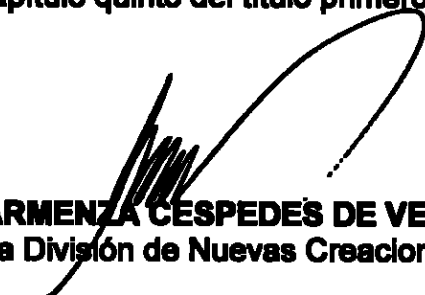
ASUNTO:	Radicación N°	04-120885
	Solicitud internacional	PCT/GB2003/01934
	Fecha inicio fase nacional	02/12/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	418
	Folios	001

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 la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la 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 título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-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 CESPEDÉS DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 24 DIC. 2004