

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 714**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/13** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2001 E 16154916 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3059314**

54 Título: **Moléculas de anticuerpos que tienen especificidad por factores alfa humanos de necrosis tumoral, y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**06.06.2000 GB 0013810**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.04.2019**

73 Titular/es:

**UCB PHARMA, S.A. (100.0%)  
Allée de la Recherche 60  
1070 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**ATHWAL, DILJEET SINGH;  
BROWN, DEREK THOMAS;  
WEIR, ANDREW NEIL CHARLES;  
POPPLEWELL, ANDREW GEORGE;  
CHAPMAN, ANDREW PAUL y  
KING, DAVID JOHN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 707 714 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de anticuerpos que tienen especificidad por factores alfa humanos de necrosis tumoral, y uso de las mismas

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo como se define en las reivindicaciones que tiene especificidad por determinantes antigénicos del factor de necrosis tumoral alfa humano (TNF $\alpha$ ). La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a procedimientos para producir el anticuerpo como se define en las reivindicaciones presentes.

10 Esta invención se refiere a anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones. En una molécula de anticuerpo, hay dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tiene en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto de cuatro regiones 5 estructurales (FR) que se alternan con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los restos de los dominios variables convencionalmente se numeran de acuerdo con un sistema ideado por Kabat y col. Este sistema se explica en Kabat y col., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en lo sucesivo Kabat y col. (supra)). En la presente memoria descriptiva se usa este sistema de numeración, excepto cuando se indique otra cosa.

15 Las denominaciones de Kabat de los restos no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos. La secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat, que corresponden a un acortamiento o a una inserción dentro de un componente estructural, ya sea una porción estructural o una CDR, de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los restos para un anticuerpo dado puede determinarse por alineación de restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat convencional.

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

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

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

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

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

Se han publicado varias revisiones que describen anticuerpos con CDR injertadas, incluyendo Vaughan y col. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

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

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

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

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

Existen niveles elevados de TNF $\alpha$  tanto en el líquido sinovial como en la sangre periférica de pacientes que sufren artritis reumatoide. Cuando se administran agentes bloqueantes de TNF $\alpha$  a pacientes que sufren artritis reumatoide, estos agentes reducen la inflamación, mejoran los síntomas y retrasan las lesiones de las articulaciones (McKown y col. (Arthritis Rheum, 42, 1204-1208, 1999).

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

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

Las moléculas de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  recombinante de la técnica anterior generalmente tienen una menor afinidad por el TNF $\alpha$  que los anticuerpos de los que proceden las regiones variables o CDR, generalmente tienen que producirse en células de mamífero y su fabricación es cara. En Stephens y col., (Immunology, 85, 668-674, 1995), y en los documentos GB-A-2 246 570 y GB-A-2 297 145 se describen anticuerpos anti-TNF $\alpha$  de la técnica anterior. Stephens describe un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humanizado (CDP571) derivado del anticuerpo CB0010 murino con un tiempo de vida media de aproximadamente 13 días y inmunogenicidad reducida que es adecuada para terapia repetitiva.

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

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

La molécula de anticuerpo comprende al menos una CDR seleccionada entre H1, H2' o H2 y H3 (SEC ID NO: 1; SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 3) para el dominio variable de la cadena pesada. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende al menos dos y más preferiblemente las tres CDR en el dominio variable de la cadena pesada.

En la presente memoria, se describe una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNF $\alpha$  humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (como se define por Kabat y col., (supra)) que tiene la secuencia indicada como L1 en la Figura 3 (SEC ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 3 (SEC ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 3 (SEC ID NO: 6) para CDRL3.

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

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

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

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

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

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

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

En la presente memoria se describe una molécula de anticuerpo con CDR injertadas. La expresión una molécula de anticuerpo con CDR injertadas, como se usa en este documento, se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una CDR híbrida) procedentes del anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en una estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano).

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

Cuando se injertan las CDR, puede usarse cualquier estructura apropiada de región variable del aceptor con respecto a la clase/tipo de anticuerpo donador del cual proceden las CDR, incluyendo regiones estructurales de ratón, de primate y humanas. Son ejemplos de estructuras humanas que pueden usarse en la presente invención KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat y col., (supra)). Por ejemplo, pueden usarse KOL y NEWM para la cadena pesada, puede usarse REI para la cadena ligera y pueden usarse EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Las regiones estructurales preferidas para la cadena ligera son las regiones estructurales humanas del grupo 1 mostradas en la Figura 1 (SEC ID NOS: 83, (85, (87 y 89)). Las regiones estructurales preferidas para la cadena pesada son las regiones estructurales humanas del grupo 1 y del grupo 3 mostradas en la Figura 2 (SEC ID NOS: 91, 93, 95 y 97 y SEC ID NOS: 106, 107, 108 y 109), respectivamente.

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

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

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

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

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

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo con CDR injertadas de acuerdo con la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene regiones estructurales humanas del grupo 1 (mostradas en la Figura 1) (SEC ID NOS: 83, 85, 87 y 89), entonces las regiones estructurales del aceptor de la cadena ligera comprenden restos del donador en las posiciones 46 y 60 (de acuerdo con Kabat y col., (supra)).

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

En la presente memoria se describe la molécula de anticuerpo puede comprender: una molécula completa de anticuerpo que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa; un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv; un monómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; un anticuerpo de una sola cadena, por ejemplo, un Fv de una sola cadena en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera están unidos por un engarce peptídico. De forma similar, las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos cuando sea apropiado.

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

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

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

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

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

El tamaño del polímero puede variarse cuando se desee, pero generalmente estará en un intervalo de pesos moleculares medios de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da y, más preferiblemente, de 25000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso deseado del producto. De esta forma, por ejemplo, cuando el producto está destinado a dejar la circulación y penetrar en un tejido, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular en el intervalo de 25000 Da a 40000 Da.

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

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

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

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

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

20 Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o reportera, éste puede prepararse por procedimientos químicos convencionales o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora o reportera antes o después de la reacción con el polímero activado según sea apropiado. Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 y WO 89/01476. Como alternativa, cuando la molécula efectora o reportera en una proteína o polipéptido, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como los descritos en los documentos WO 86/01533 y EP-A-0392745.

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

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

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

45 Además, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener un efector o una molécula reportera unida a la misma. Por ejemplo, puede tener un macrociclo para quelar un átomo de metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida al mismo por una estructura de unión covalente. Como alternativa, pueden usarse procedimientos de tecnología de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (dominios CH2, CH3 y de bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa se hayan reemplazado, o tengan unido por medio de un enlace peptídico, una proteína no inmunoglobulina funcional, tal como una enzima o una molécula de toxina.

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

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable de la cadena

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

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

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

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

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

En una realización alternativa preferida, la secuencia de ADN codifica una cadena pesada y comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO:10 (gh1hTNF40.4) o SEC ID NO: 11 (gh3hTNF40.4) o un equivalente degenerado de la misma.

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

La presente descripción también se refiere un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.  
25

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

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

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

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

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

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

45 Para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención puede usarse cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado. Pueden usarse bacterias, por ejemplo, E. coli, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo de una sola cadena, por ejemplo, Fv de una sola cadena. Pueden usarse sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpo mayores, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen CHO, células de mieloma o células de hibridoma.  
50

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

Preferiblemente el procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende cultivar células E. coli que comprenden un vector de expresión de E. coli que comprende la secuencia de ADN de la presente invención en condiciones adecuadas para producir la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ADN, y aislar la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo puede secretarse de la célula o dirigirse al periplasma por medio de secuencias señal adecuadas. Como alternativa, las moléculas de anticuerpo pueden acumularse dentro del citoplasma de la célula. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se dirige al periplasma. Dependiendo de la molécula de anticuerpo que se está produciendo y del procedimiento usado, es deseable permitir que las moléculas de anticuerpo se plieguen y adopten una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que las moléculas de anticuerpo se plieguen son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de elevación en el que esté o se considere que está el nivel de TNF $\alpha$  a neutralizar con respecto al nivel deseable y de si la molécula de anticuerpo se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.

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

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

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales

para el receptor individual de la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.

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

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

15 Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca para reconstituirse antes del uso con un líquido estéril apropiado.

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

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

30 La liberación directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o por liberación en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosificación o un programa de dosificación múltiple.

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

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

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

La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TNF $\alpha$ .

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

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

50 Por ejemplo, los niveles elevados de TNF $\alpha$  están implicados en trastornos inmunes e inmunorreguladores agudos y crónicos, infecciones que incluyen el choque séptico, endotóxico y cardiovascular, trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades malignas y hepatitis inducida por alcohol. En el documento US-A-5 919 452 se indican detalles de los numerosos trastornos asociados con los niveles elevados de TNF $\alpha$ . La molécula de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse en la terapia de enfermedades mediadas por TNF $\alpha$ .  
55 . Las enfermedades particularmente relevantes que pueden tratarse por la molécula de anticuerpo de la presente

invención incluyen enfermedad de Crohn y enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide y osteoartritis.

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

5 En la presente memoria también se describe un procedimiento para tratar a los seres humanos a sujetos animales que sufren o que están en riesgo de padecer un trastorno mediado por TNF $\alpha$  , comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo de la presente invención.

La molécula de anticuerpo de la presente descripción también puede usarse en la diagnosis, por ejemplo, en la diagnosis in vivo y en la formación de imágenes de estados de enfermedad que implican niveles elevados de TNF $\alpha$  .

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

20 Se ha descubierto que las moléculas de anticuerpo que comprenden una CDR híbrida retienen sustancialmente la misma afinidad de unión que una molécula de anticuerpo que comprende las CDR del donador completas. El término sustancialmente la misma afinidad de unión, como se usa en este documento, significa al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 85% y aún más preferiblemente al menos un 95% de la afinidad de unión de la molécula de anticuerpo correspondiente que comprende las CDR del donador completas. Como se ha indicado anteriormente, en ciertos casos, la afinidad del anticuerpo de la invención puede ser mayor que la del anticuerpo  
25 donador. El uso de una CDR híbrida proporciona las ventajas de reducir la cantidad de secuencia extraña (es decir, donadora) presente en la molécula de anticuerpo y puede aumentar la afinidad de unión de la molécula de anticuerpo en comparación con la molécula de anticuerpo correspondiente que comprende las CDR del donador completas.

Preferiblemente, la CDR2 de la cadena pesada es híbrida en la molécula de anticuerpo.

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

35 Dependiendo de la secuencia de la porción truncada de la CDR y de la secuencia de la secuencia diferente que reemplaza a la porción que falta, pueden realizarse varios cambios de aminoácido. Preferiblemente se realizan al menos dos cambios de aminoácidos, más preferiblemente se realizan al menos 3 cambios de aminoácidos y aún más preferiblemente se realizan al menos 4 cambios de aminoácidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 5 la Figura 4 muestra el vector pMR15.1;  
 la Figura 5 muestra el vector pMR14;  
 la Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista del hTNF40VI murino (SEC ID NO: 99);  
 la Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista del hTNF40Vh murino (SEC ID NO: 100);  
 la Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de hTNF40-gLI (SEC ID NO: 8);  
 10 la Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de hTNF40-gL2 (SEC ID NO: 9);  
 la Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de gH1hTNF40.4 (SEC ID NO: 10);  
 la Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11);  
 la Figura 12 muestra el vector CTIL5-gL6;  
 15 la Figura 13 muestra la estructura de un compuesto denominado CDP870 que comprende un fragmento Fab modificado derivado del anticuerpo hTNF40 unido covalentemente a través de un resto de cisteína a un engarce de lisil-maleimida, teniendo cada grupo amino en el resto de lisilo unido covalentemente un resto metoxi PEG, siendo n aproximadamente 420;  
 la Figura 14 muestra el vector pTTQ9;  
 la Figura 15 muestra la secuencia del adaptador oligonucleotídico OmpA (SEC ID NO: 101);  
 20 la Figura 16 muestra el vector pACYC184;  
 la Figura 17 muestra el vector pTTO-1;  
 la Figura 18 muestra el vector pTTO-2;  
 la Figura 19 muestra el vector pADNbEng-G1;  
 25 la Figura 20 muestra los cassettes oligonucleotídicos que codifican diferentes secuencias intergénicas para la expresión de Fab modificada en E. coli (SEC ID NOS: 102 a 105);  
 la Figura 21 muestra la acumulación periplásmica de Fab modificados de variantes de IGS;  
 la Figura 22 muestra el vector pTTO (CDP870);  
 30 la Figura 23 muestra la puntuación de actividad de enfermedad (DAS) en pacientes tratados con diferentes dosis de CDP870 y placebo. Se presentan medias e intervalos IQ para la población por protocolo con la última observación tomada. Los cuadrados pequeños indican placebo, los diamantes indican 1 mg/kg, los triángulos 5 mg/kg y los cuadrados grandes indican 20 mg/kg;  
 35 la Figura 24 muestra el recuento de articulaciones sensibles, el recuento de articulaciones hinchadas, la puntuación del dolor, la evaluación global de la actividad de la enfermedad por parte del evaluador, el cuestionario de evaluación de salud modificado (HAQ), la proteína C reactiva (CRP) y la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) en pacientes tratados con diferentes dosis de CDP870 y placebo. Se presentan la media y el intervalo IQ para la población por protocolo con la última observación tomada. Los cuadrados pequeños indican placebo, los diamantes indican 1 mg/kg, los triángulos indican 5 mg/kg y los cuadrados grandes indican 20 mg/kg.

### Ejemplos

Clonación de genes y expresión de una molécula quimérica de anticuerpo hTNF40

- 40 Preparación de ARN a partir de células de hibridoma hTNF40

El ARN total se preparó a partir de  $3 \times 10^7$  células de hibridoma hTNF40 como se describe más adelante. Las células se lavaron en solución fisiológica salina y se disolvieron en RNazol (0,2 ml por 106 células). Se añadió cloroformo (0,2 ml por 2 ml de homogeneizado), la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y después se dejó en hielo durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica resultantes se separaron por centrifugación durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf y el ARN se precipitó de la fase acuosa por medio de la adición de

45

un volumen igual de isopropanol. Después de 15 minutos en hielo, el ARN se sedimentó por centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en agua sin RNAsa estéril. El rendimiento de ARN fue de 400  $\mu$ g.

#### Clonación por PCR de hTNF40 Vh y VI

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

#### a) Síntesis de ADNc

10 El ADNc se sintetizó en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l que contenía los siguientes reactivos: Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, ditiotretitol 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración 0,5 mM, 20 unidades de RNAsin, 75  $\mu$ g de cebador hexanucleotídico aleatorio, 2  $\mu$ g de ARN de hTNF40 y 200 unidades de transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney. Después de la incubación a 42 DEG C durante 60 minutos, la reacción se terminó por calentamiento a 95 DEG C durante 5 minutos.

#### b) PCR

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

25 Los cebadores 3' se muestran en la Tabla 3. El cebador de cadena ligera abarca la unión J-C del anticuerpo y contiene un sitio de restricción para la enzima Sp1I para facilitar la clonación del fragmento VI de PCR. Los cebadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abarcar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de restricción Apal para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta basada en las encontradas en anticuerpos de ratón conocidos (Kabat y col., 1991, supra).

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

35 Las incubaciones (100  $\mu$ l) para la PCR se establecieron como se indica a continuación. Cada reacción contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 10 pmol de mezcla de cebador 5' (Tabla 4), 10 pmol de cebador 3' (CL12 (cadena ligera) o R2155 (cadena pesada) (Tabla 3)), 1  $\mu$ l de ADNc y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se incubaron a 95 DEG C durante 5 minutos y después se ciclaron por medio de tratamiento a una temperatura de 94 DEG C durante 1 minuto, de 55 DEG C durante 1 minuto y de 72 DEG C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron alícuotas de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa. Las reacciones de cadena ligera que contenían mezclas de cebadores 5' de los conjuntos de cadena ligera 1, 2 y 7 produjeron bandas con tama PRG nos consistentes con fragmentos VI de longitud completa, mientras que la reacción del conjunto 3 de reacción de cadena pesada produjo un fragmento con el tama PRG no esperado de un gen Vh. La banda producida por los cebadores del conjunto 1 de cadena ligera no se siguió, ya que los resultados previos habían demostrado que esta banda corresponde a un pseudogen de cadena ligera producida por la célula de hibridoma. La banda producida por los cebadores del conjunto 7 de cadena ligera fue más débil que la banda procedente de los cebadores del conjunto 2 y, por lo tanto, no se siguió. Sólo se siguió la banda del conjunto 2 de reacción de cadena ligera, que era la banda más fuerte.

#### c) Clonación molecular de los fragmentos de PCR

50 Los fragmentos de ADN producidos en el conjunto 2 de reacción de cadena ligera se digirieron con las enzimas BstBI y Sp1I, se concentraron por precipitación con etanol, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,4% y se recuperaron las bandas de ADN en el intervalo de 400 pares de bases. Éstas se clonaron por unión al vector pMR15.1 (Figura 4) que se había restringido con BstBI y Sp1I. Después de la unión, las mezclas se usaron para transformar células E. coli LM 1035 y los plásmidos de las colonias bacterianas resultantes se seleccionaron con respecto a los insertos por digestión con BstBI y Sp1I. Los representantes con insertos de cada unión se analizaron adicionalmente por medio de la secuenciación de nucleótidos.

55 De una forma similar, los fragmentos de ADN producidos en el conjunto 3 de reacción de cadena pesada se digirieron con HindIII y Apal y se clonaron en el vector pMR14 (Figura 5) que se había restringido con HindIII y Apal.

De nuevo, los plásmidos representativos que contenían insertos se analizaron por medio de la secuenciación de nucleótidos.

d) Análisis de la secuencia de nucleótidos

5 El ADN plasmídico de varios aislados que contenían insertos de Vh se secuenció usando los cebadores R1053 (véase la Tabla 5) (que ceba en la región 3' del promotor HCMV en pMR14) y R720 (véase la Tabla 5) (que ceba la región 5' de C-gamma 4 y permite la secuenciación a través del inserto de ADN en pMR14). Se descubrió que las secuencias de nucleótidos del inserto Vh en varios clones eran idénticas, excepto por las diferencias en el péptido señal y en las regiones J. Esto indicó que los clones examinados son aislados independientes debidos al uso de 5 diferentes cebadores de la mezcla de oligonucleótidos durante la fase de PCR. La secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos prevista del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo hTNF40 (hTNF40Vh) se proporcionan en la Figura 7 (SEC ID NO: 100).

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

**TABLA 1**

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

- CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEQ ID NO:13)
- CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEQ ID NO:14)
- 25 CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAACTGGGTTTT3' (SEQ ID NO:15)
- CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEQ ID NO: 16)
- CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3' (SEQ ID NO:17)
- CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEQ ID NO:18)
- CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEQ ID NO:19)
- 30 CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEQ ID NO:20)
- CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEQ ID NO:21)
- CH10 : 5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCT3' (SEQ ID NO:22)
- CH11 : 5'ATGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEQ ID NO:23)
- CH12 : 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

35 Cada uno de los cebadores anteriores tiene la secuencia  
5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC3' (SEC ID NO: 25) añadida 20 a su extremo 5'.

**TABLA 2**

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

- CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:26)
- 40 CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEQ ID NO:27)
- CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEQ ID NO:28)
- CL4 : 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEQ ID NO:29)
- CL5 : 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:30)
- CL5A : 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:31)

## ES 2 707 714 T3

- CL6 : 5'ATGAGGT(T,G)C(T,G)(T,G)Tg(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)CTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:32)
- CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEQ ID NO:33)
- CL8 : 5'ATGTGGGA(t,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3' (SEQ ID NO:34)
- CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)
- 5 CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTTC3' (SEQ ID NO:36)
- CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3'(SEQ ID NO:37)
- CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEQ ID NO:38)
- CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)
- CL13 : 5'ATGGATTACAGGCCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)
- 10 CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)
- CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)
- CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)
- CL17A: 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)
- CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)
- 15 CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)
- Cada uno de los cebadores anteriores tiene la secuencia 5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEC ID NO: 47) añadida a su extremo 5'.

### TABLA 3

Cebadores oligonucleotídicos para los extremos 3' de los genes Vh y VI de ratón.

- 20 Cadena ligera (CL12):5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3' (SEC ID NO: 48)
- Cadena pesada (R2155):5'GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA3' (SEC ID NO: 49).

### TABLA 4

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

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

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

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

TABLA 5

Cebadores usados en el análisis de la secuencia de nucleótidos

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

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

5 Evaluación de actividades de genes quiméricos

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

10 a) Producción de molécula de anticuerpo hTNF40 quimérica

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

15 Un día antes de la transfección, se tripsinizaron matraces semiconfluentes de células CHO-L761, las células se contaron y los matraces T75 se prepararon, cada uno, con 107 células.

20 Al día siguiente, el medio de cultivo se cambió 3 horas antes de la transfección. Para la transfección, se preparó el precipitado con fosfato cálcico mezclando 1,25 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M que contenía 50  $\mu\text{g}$  de cada uno de los vectores de expresión de cadena pesada y ligera con 1,25 ml de 2 x HBS (16,36 g de NaCl, 11,0 g de HEPES y 0,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en un 1 litro de agua con el pH ajustado a 7,1 con NaOH) y añadiéndose inmediatamente al medio de las células. Después de 3 h a 37 DEG C en un incubador de  $\text{CO}_2$ , se retiraron el medio y el precipitado y las células se sometieron a un choque por medio de la adición de 15 ml de glicerol al 15% en solución salina tamponada con fosfato (PES) durante 1 minuto. El glicerol se retiró, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 48-96 horas en 25 ml de medio que contenía butirato sódico 10 mM. El anticuerpo pudo purificarse del medio de cultivo por unión y elución de proteína A-Sepharose.

25 b) ELISA

30 Para el ELISA, se recubrieron placas ELISA Nunc durante una noche a 4 DEG C con un fragmento F(ab)2 de un anticuerpo policlonal específico de cabra anti-fragmento Fc humano (Jackson Immunoresearch, código 109-006-098) a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón de recubrimiento (carbonato sódico 15 mM, carbonato sódico ácido 35 mM, pH 6,9). El anticuerpo sin recubrir se retiró lavando 5 veces con agua destilada. Las muestras y los patrones purificados a cuantificar se diluyeron hasta aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón de conjugado (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, NaCl 0,1 M, Tween 20 al 0,2% v/v, caseína de Hammersten al 0,2% p/v). Las muestras se valoraron en los pocillos de microvaloración en diluciones a la mitad proporcionando un volumen final de 0,1 ml en cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Después de la primera etapa de incubación, las placas se lavaron 10 veces con agua destilada y después se incubaron durante 1 hora como se ha indicado anteriormente con 0,1 ml de un anticuerpo conjugado con peroxidasa monoclonal de ratón anti-kappa humana (clon GD12) (The Binding Site, código MP135) a una dilución de 1 en 700 en tampón de conjugado. La placa se lavó de nuevo y se añadió a cada pocillo solución de sustrato (0,1 ml). La solución de sustrato contenía 150  $\mu\text{l}$  de N,N,N,N-tetrametilbencidina (10 mg/ml en DMSO), 150  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno (solución al 30%) en 10 ml de acetato sódico 0,1 M/citrato sódico, pH 6,0. La placa se reveló durante 5-10 minutos hasta que la absorbancia a 630 nm fue de aproximadamente 1,0 para el patrón superior. La absorbancia a 630 nm se midió usando un lector de placas y la concentración de la muestra se determinó comparando las curvas de valoración con las del patrón.

40 c) Determinación de constantes de afinidad por análisis BiaCore

45 La interacción de unión entre hTNF40 y TNF humano se investigó usando la tecnología BIA. Un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad, dirigido contra la región constante de hTNF40, se inmovilizó en la superficie de un chip sensor de polímero de dextrano usando la química NHS/EDC convencional. Se capturaron niveles relativamente bajos (200-500 RU) de hTNF40 para asegurar que se minimizaban los efectos del transporte de masa. Se pasó TNF humano a diferentes concentraciones sobre el hTNF40 capturado para permitir la evaluación de las cinéticas de asociación. Después de la inyección del ligando, el tampón se pasó sobre la superficie de forma que 1 pudiera medirse la disociación. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación y disociación para la interacción entre el hTNF40 en fase sólida y el hTNF40 humano y se obtuvo un valor KD.

50 Ejemplo 1

Injerto de CDR de hTNF40

Anteriormente se ha descrito la clonación molecular de genes para las regiones variables de las cadenas pesada y

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

Injerto con CDR de la cadena ligera de hTNF40

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

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

Construcción de la cadena ligera hTNF40-gL1 con CDR injertada

20 La construcción de hTNF40-gL1 se proporciona más adelante con detalle. En las Reacciones de Cadena de Polimerasa (PCR) se usaron los siguientes oligonucleótidos solapantes (P7982-P7986) para montar una cadena ligera injertada trunca. El fragmento montado carece de la secuencia directora del anticuerpo y de los 17 primeros aminoácidos de la estructura 1.

oligo 1 P7982:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGGTAATAAC  
GTAGCCTGGTATCAGCAA3' (SEQ ID NO:52)

oligo 2 P7983:

25 5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTTACCTGGTTT  
TTGCTGATACCAGGCTACGT3' (SEQ ID NO:53)

oligo 3 P7984:

5' TACAGTGCCCTTTTCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTACGCGGATCCG  
GTAGTGGTACTGATTTAC3' (SEQ ID NO:54)

oligo 4 P7985

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

30 oligo 5 P7986:

5'ATTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACATTCCGGT  
CAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (SEQ ID NO:56)

Fwd P7981:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (SEQ ID NO:57)

Bwd P7980

35 5'GAATCCGTCAGTTTGATTTCTACTTTAGT3' (SEQ ID NO:58),

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

La mezcla de unión se usó para transformar la cepa LM1035 de E. coli y las colonias resultantes se analizaron por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la región VI de hTNF40-gL1 se muestra en la Figura 8 (SEC ID NO: 8).

Construcción de la cadena ligera hTNF40-gL2 con CDR injertada

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

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

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

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

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

Se prepararon dos reacciones, cada una de 20  $\mu$ l, que contenían Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 0,1  $\mu$ g de hTNF40-gL1, 6 pmol de R1053/R5350 o R5349/R684 y 0,25 unidades de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por medio del tratamiento a 94 DEG C durante 1 minuto, a 55 DEG C durante 1 minuto y a 72 DEG C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, cada reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa y los fragmentos de PCR se escindieron del gel y se recuperaron usando un estuche Mermaid.

Después se sometieron alícuotas de estas reacciones a una segunda vuelta de PCR. La reacción, de 100  $\mu$ l, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, 1/5 de cada uno de los fragmentos de PCR de la primera serie de reacciones, 30 pmol de R1053 y R684 y 2,5 unidades de Taq polimerasa. Las temperaturas de reacción fueron como se han indicado anteriormente. Después de la PCR, la mezcla se extrajo con fenol/cloroformo y después con cloroformo y se precipitó con etanol. El precipitado de etanol se recuperó por centrifugación, se disolvió en el tampón apropiado y se restringió con las enzimas BstEII y SphI. El producto resultante finalmente se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento de ADN de 270 pares de bases recuperado a partir de un corte de gel se unió al vector pMRI5.1 (Figura 4) que previamente se había digerido con las mismas enzimas.

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

Injerto con CDR de la cadena pesada de hTNF40

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

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

En la Figura 2 se muestra una comparación de hTNF40 con las dos regiones estructurales diferentes, en la que se puede ver que hTNF40 difiere del consenso del subgrupo 1 humano en 32 posiciones (subrayadas) y difiere del consenso del subgrupo 3 humano en 40 posiciones (subrayadas). Después del análisis de la contribución que podía hacer cualquiera de estas diferencias a la unión del antígeno, se retuvieron los restos 28, 38, 46, 67, 69 y 71 como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gH1hTNF40.1 usando la estructura del grupo 1. Los restos 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 y 78 se retuvieron como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gh3hTNF40.4 usando la estructura del grupo 3. Los restos 28, 69 y 71 se retuvieron como donadores en la cadena pesada injertada con CDR gH1hTNF40.4 usando la estructura del grupo 1.

Construcción de la cadena pesada injertada con CDR gH1hTNF40.4

10 gH1hTNF40.4 (SEC ID NO: 10) se montó sometiendo oligonucleótidos solapantes a PCR en presencia de los cebadores apropiados. En la PCR se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Injerto del grupo 1

oligo 1 P7989:

5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCTGCACCTGAG  
AGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:63)

15 oligo 2 P7990:

5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAGGCTAC  
GTGTTACAGACTATGGTA3' (SEQ ID NO:64)

oligo 3 P7991:

5'CCAACCCATCCATTTTCAGGCCTTGTCCCGGGCCTGCTTGACCCAATTCATAC  
CATAGTCTGTGAACACGT3' (SEQ ID NO:65)

oligo 4 P7995:

20 5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTTC3' (SEQ ID NO:66)

oligo 5 P7992:

5'CCATGTATGCAGTGC GTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCTGCCCTT  
GAA3' (SEQ ID NO:67)

oligo 6 P7993:

5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGACACCGC  
AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:68)

25 oligo 7 P7994:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATCCTCTAG  
CACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3' (SEQ ID NO:69)

Fwd: P7988:

5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:70)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

5 La reacción de montaje, de 100 µl, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 2 pmol de cada uno de p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 y p7994, 10 pmol de cada uno de p7988 y p7987 y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por tratamiento a una temperatura de 94 DEG C durante 1 minuto, de 55 DEG C durante 1 minuto y de 72 DEG C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, la reacción se extrajo con fenol/cloroformo (1/1), después con cloroformo y se precipitó con etanol. Después de la centrifugación, el ADN se disolvió en el tampón de restricción apropiado y se digirió con ApaI y KpnI. El fragmento resultante se aisló en un gel de agarosa y se unió a pMR14 (Figura 5), que 1 previamente se había digerido con las mismas enzimas. pMR14 contiene la región constante de la cadena pesada gamma 4 humana. Cuando pMR14 se escinde con ApaI y KpnI, el vector escindido es capaz de recibir el ADN digerido de tal forma que el extremo 3' del ADN digerido se una en fase de lectura al extremo 5' de la secuencia que codifica la región constante gamma 4. Por lo tanto, la cadena pesada expresada a partir de este vector será un isotipo gamma 4. La mezcla de unión se usó para transformar E. coli LM1035 y las colonias bacterianas resultantes se seleccionaron por digestión de restricción y por análisis de la secuencia de nucleótidos. De esta forma, se identificó un plásmido que contenía la secuencia correcta para gh1hTNF40.4 (Figura 10) (SEC ID NO: 10).

Construcción de la cadena pesada injertada con CDR gh3hTNF40.4

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

Injerto del grupo 3

oligo 1 P7999:

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

oligo 2 P8000:

25 5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCTGGTTACG  
TCTTCACAGACTATGGAA3' (SEQ ID NO:73)

oligo 3 P8001

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

oligo 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTATTTATGT  
TGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (SEQ ID NO:66)

30 oligo 5 P7997:

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

oligo 6 P7998:

1 5'CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGACACCGC  
AGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:76)

oligo 7 P7993:

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

Fwd P7996:

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC3' (SEQ ID NO:78)

5 Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (SEQ ID NO:71)

La reacción de montaje, de 100 µl, contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% p/v, cada desoxirribonucleósido trifosfato a una concentración de 0,25 mM, 2 pmol de cada uno de p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 y p7993, 10 pmol de cada uno de p7996 y p7987 y 1 unidad de Taq polimerasa. Las reacciones se ciclaron por tratamiento a una temperatura de 94 DEG C durante 1 minuto, de 55 DEG C durante 1 minuto y de 72 DEG C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, la reacción se extrajo con fenol/cloroformo (1/1), después con cloroformo y se precipitó con etanol. Después de la centrifugación, el ADN se disolvió en el tampón de restricción apropiado y se digirió con ApaI y KpnI. El fragmento resultante se aisló en un gel de agarosa y se unió a pMR14 (Figura 5), que previamente se había digerido con las mismas enzimas. pMR14 contenía la región constante de la cadena pesada gamma 4 humana. Cuando pMR14 se escinde con ApaI y KpnI, el vector escindido es capaz de recibir el ADN digerido de tal forma que el extremo 3' del ADN digerido se una en fase de lectura al extremo 5' de la secuencia que codifica la región constante gamma 4. Por lo tanto, la cadena pesada expresada a partir de este vector será un isotipo gamma 4. La mezcla de unión se usó para transformar E. coli LM1035 y las colonias bacterianas resultantes se seleccionaron por digestión de restricción y por análisis de la secuencia de nucleótidos. De esta forma, se identificó un plásmido que contenía la secuencia correcta para gh3hTNF40.4 (SEC ID NO: 11) (Figura 11).

#### Producción del fragmento Fab modificado con CDR injertada

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

- (i) marcador de resistencia a tetraciclina - antibiótico no inactivado por el producto del gen de resistencia, por lo tanto, se mantiene la selección de las células que contienen el plásmido;
- (ii) bajo número de copias - origen de replicación derivado del plásmido p15A, que es compatible con plásmidos que contienen replicones derivados de colE1;
- (iii) promotor tac fuerte inducible para la transcripción de genes clonados;
- (iv) gen lacIq - proporciona la expresión constitutiva de la proteína represora lac, manteniendo al promotor tac en el estado reprimido hasta la inducción con IPTG/alolactosa;
- (v) secuencia señal de OmpA - proporciona la secreción periplásmica de los genes clonados;
- (vi) acoplamiento traduccional de la secuencia señal de OmpA a un péptido lacZ corto, proporcionando una iniciación eficaz de la traducción.

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

#### Materiales y métodos

##### Técnicas de ADN

Para los protocolos se usaron procedimientos convencionales, incluyendo restricción de ADN, electroforesis en gel de agarosa, unión y transformación. Las enzimas de restricción y las enzimas de modificación del ADN se obtuvieron en New England Biolabs o Boehringer Mannheim, y se usaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los fragmentos de ADN se purificaron en agarosa usando el protocolo GeneClean (BIO 101). Los oligonucleótidos se suministraron por el Oswel Oligonucleótido Service y se sintetizaron a la escala de 40 nm. El ADN plasmídico se aisló usando estuches de ADN Plasmídico Mini/Midi de Qiagen. La PCR se realizó usando Amplitaq de Perkin Elmer

como se recomienda. La secuenciación del ADN se realizó usando el estuche de secuenciación de ciclos Taq de Applied Biosystems.

Inducción de matraces de agitación

5 Se desarrollaron cultivos de *E. coli* W3110 en caldo L suplementado con tetraciclina (7,5 µg/ml). Para las inducciones, se diluyeron cultivos de una noche recientes (desarrollados a 30 DEG C) a una DO600 de 0,1 en 200 ml de caldo L en un matraz de 2 litros tabicado y se dejaron crecer a 30 DEG C en una incubador orbital. A una DO600 de 0,5, se añadió IPTG a una concentración de 200 µM. Se tomaron muestras (normalizadas para DO) a intervalos.

Extracción periplásmica

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

Ensayo de montaje

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

Construcción del plásmido pTTO-1

(a) Reemplazo del poliengarce pTTQ9

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

(b) Preparación y unión de fragmentos

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

55 Una alícuota (2 µg) del plásmido pTQOmp se digirió con enzimas SspI y EcoRI, y el fragmento de 2350 pb se purificó de los fragmentos indeseados de 2040 pb y 170 pb por electroforesis en gel de agarosa; este fragmento codifica la región terminadora de la transcripción y el gen lacIq. Otra alícuota (2 µg) de pTQO se digirió con EcoRI y XmnI, generando fragmentos de 2289, 1670, 350 y 250 pb. El fragmento de 350 pb, que codifica el promotor tac, la secuencia señal de OmpA y el sitio de multiclonación, se purificó en gel.

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

Inserción de regiones variables de hTNF40 humanizado en pTTO-2

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

cebador 5':

CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCUGGCTGGMCGCTACCGTAGCGCAAG CTGACATTCAAATGACCCAG AGCCC  
(SEC ID NO:79)

cebador 3': TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEC ID NO:80)

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

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

cebador 5':

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG CTGAGGTTTCAGCTGGTCCG  
AGTCAGGAGGC (SEC ID NO:81)

cebador 3': GCCTGAGTTCCACGACAC (SEC ID NO:82)

Después de la PCR, el producto se purificó, se digirió con las enzimas NheI y ApaI y después se sub-clonó en el vector pADNbEng-G1 (Figura 19). Después de la verificación por secuenciación del ADN, la cadena pesada se restringió con la enzima EcoRI y se sub-clonó en el sitio EcoRI de pTTO(hTNF40L) para crear el plásmido de expresión de E. coli pTTO(hTNF40).

Optimización de la secuencia intergénica para la expresión de Fab modificado

En el vector pTTO, la expresión del Fab modificado se produce a partir de un mensajero dicistrónico que codifica primero la cadena ligera y después la cadena pesada. La secuencia de ADN entre los dos genes (secuencia intergénica, IGS) puede influir sobre el nivel de expresión de la cadena pesada afectando a la velocidad de iniciación de la traducción. Por ejemplo, una secuencia intergénica corta puede ocasionar un acoplamiento de traducción entre las cadenas ligera y pesada, ya que el ribosoma de traducción puede no disociar completamente el ARNm después de completar la síntesis de la cadena ligera antes de iniciar la síntesis de la cadena pesada. La fuerza de cualquier sitio de unión a ribosomas de Shine Dalgarno (SD) (homología con el ARNr 16S) también puede tener un efecto, así como la distancia y la composición de la secuencia entre el SD y el codón de iniciación ATG. La estructura secundaria potencial del ARNm alrededor del ATG es otro factor importante; el ATG debe estar en un bucle y no limitado dentro de un tramo recto, mientras que se aplica lo contrario al SD. De esta manera, modificando la composición y la longitud del IGS, es posible modificar la fuerza de iniciación de la traducción y, por lo tanto, el nivel de producción de cadena pesada. Es probable que necesite conseguirse una velocidad óptima de iniciación de la traducción para maximizar la expresión de la cadena pesada de un Fab modificado dado. Por ejemplo, con un Fab modificado, puede tolerarse un alto nivel de expresión, pero para un Fab modificado diferente con una secuencia de aminoácidos diferente, un alto nivel de expresión podría resultar tóxico, quizás a causa de las diferentes eficacias de secreción o plegamiento. Por esta razón, se diseñó una serie de cuatro secuencias intergénicas (Figura 20), permitiendo la determinación empírica de la IGS óptima para los Fab modificados basados en hTNF40. IGS1 e IGS2 tienen secuencias intergénicas muy cortas (-1 y +1 respectivamente) y sería de esperar que proporcionaran una traducción muy acoplada; las secuencias SD (subrayadas) son sutilmente diferentes. Lo más probable es que estas dos secuencias confieran un alto nivel de iniciación de la traducción. IGS3 e IGS4 tienen una mayor distancia entre los codones de iniciación y de parada (+13) y difieren en su composición de secuencia; IGS3 tiene una secuencia SD más fuerte. En todas las secuencias se estudió la estructura secundaria (usando el programa m/fold) y se optimizaron tanto como fue posible; sin embargo, con un fuerte acoplamiento de traducción de las dos cadenas, la ausencia de disociación ribosómica significa que el ARNm puede no estar expuesto, impidiendo la formación de la estructura secundaria.

## Clonación de variantes de IGS

Los cassettes IGS mostrados en la Figura 20 tienen sitios de Clonación SacI y MunI flanqueantes. Se construyeron templando pares de oligonucleótidos complementarios. Se preparó un fragmento de vector digiriendo pTTO(hTNF40) con SacI y NotI y se preparó un fragmento de cadena pesada digiriendo pADNbEngG1(hTNF40H) con MunI y NotI. Después se realizaron uniones de 3 vías, usando cantidades equimolares de los dos fragmentos de restricción y aproximadamente 0,05 pmol de cada cassette de oligonucleótido templado. De esta forma se crearon los cuatro plásmidos de expresión pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3) y pTTO(hTNF40 IGS-4).

## Análisis de expresión en matraz de agitación

Los cuatro plásmidos se utilizaron para transformar la cepa W3110 de *E. coli* junto con la construcción de expresión original, y después esta cepa se analizó con respecto a la expresión en matraces de agitación como se ha descrito anteriormente. En la Figura 21 se muestran los resultados de un experimento típico. Las diferentes secuencias intergénicas confieren diferentes perfiles de expresión. IGS1 e IGS2 acumulan Fab modificado periplásmico rápidamente, observándose un pico una hora después de la inducción, después de lo cual disminuye el nivel recuperado. En el caso de IGS1 el pico es mayor y la caída más aguda. Estos resultados son coherentes con un alto nivel de síntesis, como era de esperar por el estricto acoplamiento traduccional para estas construcciones. Aparentemente, IGS1 confiere un mayor nivel de expresión de cadena pesada que IGS2. En este caso, parece ser que este alto nivel de expresión se tolera mal, ya que los niveles de expresión periplásmicos se reducen después del pico de 1 hora. Esto se observa en el perfil de crecimiento del cultivo de IGS1 (no mostrado), que muestra picos 1 hora después de la inducción antes de la disminución, lo que sugiere muerte y lisis celular. IGS3 acumula Fab modificado más lentamente, pero alcanza picos 2 horas después de la inducción observándose un pico mayor (325 nm/ml/DO) antes de que se reduzcan los niveles. El crecimiento de este cultivo continuó hasta 3 horas después de la inducción y alcanzó una biomasa pico mayor (no mostrada). Esto es coherente con un nivel menor de síntesis de cadenas pesadas. IGS4 acumula material a una velocidad más lenta y no puede alcanzar el pico elevado de productividad de las otras tres construcciones. Todas las variantes de IGS superan al vector original significativamente. La hipótesis de que las diferentes secuencias de IGS confieren diferentes velocidades de iniciación de la traducción se confirma por estos resultados experimentales. Para el Fab modificado basado en hTNF40, parece ser que una alta velocidad de iniciación de la traducción de la cadena pesada se tolera mal y, por lo tanto, no es óptima. Una velocidad más lenta, como la conferida por IGS3, proporciona mejores características de crecimiento y, por consiguiente, se acumula un mejor rendimiento a lo largo del tiempo.

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

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

## PEGilación de Fab modificado basado en hTNF40 con CDR injertada

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

Eficacia del Fab modificado basado en hTNF40 con CDR injertada PEGilado (CDP870) en el tratamiento de la artritis reumatoide

CDP870 tiene una vida media prolongada de aproximadamente 11 días.

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

## Métodos

*Pacientes:*

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

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

*Protocolo de tratamiento:*

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

*Evaluación clínica:*

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

*Concentración de CDP870 en plasma y anticuerpos anti-CDP870:*

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

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

*Análisis estadístico*

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

**Resultados**

*Demografía:*

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

**TABLA 6** Detalles demográficos (media +- desviación típica)

	Número	Sexo (M:F)	Edad	Duración enfermedad	Factor reumatoide	Número de DMARD previos
Placebo	12	1.11	51±8	12±8	8(67%)	5±1
1 mg/kg	8	1:7	59±7	12±7	4(50%)	4±1
5m g/kg	8	2:6	54±13	13±5	5(63%)	5±2
20 mg/kg	8	2.6	61±11	14±13	4(50%)	4±2

*Eficacia clínica:*

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

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

*Acontecimientos adversos*

20 El tratamiento fue bien tolerado sin reacciones relacionadas con la infusión. No se identificó ninguna reacción alérgica ni exantema cutáneo. En la fase doble ciego, hubo 19, 38, 8 y 14 acontecimientos adversos en los grupos de placebo, 1, 5 y 20 mg/kg, respectivamente. Los acontecimientos adversos más comunes fueron dolor de cabeza, con 9 episodios en 5 pacientes (1 placebo, 3 a 1 mg/kg y 1 a 20 mg/kg). Un paciente que recibió placebo y tres pacientes que recibieron CDP870 (1 a 5 mg/kg y 2 a 20 mg/kg) desarrollaron infecciones del tracto respiratorio inferior. Estos acontecimientos se consideraron leves o moderados. Se trataron con antibióticos orales y se resolvieron en un período de 1-2 semanas. Tres pacientes de cada uno de los grupos de 1 y 5 mg/kg y uno del grupo de 20 mg/kg desarrollaron una infección del tracto urinario 1-2 meses después del tratamiento con CDP870.

25 Un acontecimiento adverso, que era un episodio de dolor de cuello que se produjo tres días después de la infusión con 1 mg/kg, se consideró grave. Se observó un aumento de anticuerpos antinucleares en 4 pacientes: 1 en el grupo del placebo (negativo a 1/40), 2 en el grupo de 1 mg/kg (negativo a 1/40, negativo a 1/80) y 1 en el grupo de 20 mg/kg (negativo a 1/40). No se encontró ningún cambio en los anticuerpos anti-ADN o anti-cardiolipina.

*Concentración de CDP870 en plasma y niveles de anti-CDP870*

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

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

*Discusión*

40 El TNF $\alpha$  neutralizador es una estrategia de tratamiento eficaz en RA. Actualmente, requiere el uso de agentes biológicos tales como un mAb quimérico o una proteína de fusión de receptor soluble/Fc humano, que son caros de fabricar. Un agente neutralizador de TNF $\alpha$  terapéutico necesita unirse a TNF $\alpha$  con alta afinidad y tener una alta vida media en plasma, baja antigenicidad y alta tolerancia y seguridad. También necesita ser accesible a todos los pacientes con RA que puedan aprovecharse del bloqueo de TNF $\alpha$ . Una tecnología que podría conseguir estos objetivos es la conjugación con polietilenglicol de un fragmento de anticuerpo de unión a TNF $\alpha$  obtenido en *E. coli*. En este estudio preliminar, los presentes solicitantes descubrieron que CDP870, un Fab modificado PEGilado, anti-TNF $\alpha$ , es eficaz y se tolera bien por los pacientes con RA.

45 Los estudios in vitro han demostrado que CDP870 tiene una actividad neutralizadora de TNF $\alpha$  similar al anticuerpo

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

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

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

#### Lista de secuencias

<110> UCB Pharma SA

<120> Moléculas de anticuerpos que tienen especificidad por factores alfa de necrosis de tumores humanos, y uso de las mismas

<130> PA406 EP DIV2

<150>EP01934209.6

<151> 2001-06-05

<150>EP09176251.8

<151> 2009-11-17

<160> 129

<170> PatentIn Versión. 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRH1

<400> 1

Asp	Tyr	Gly	Met	Asn
1				5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40/CDRH2 híbrida humana

<400> 2

ES 2 707 714 T3

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

Gly

5 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRH3

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5

15 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRL1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
 1 5 10

25 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRL2

35 <400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
 1 5

40 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

50 <210> 7  
 <211> 17

ES 2 707 714 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia artificial:hTNF40 CDRH2

<400> 7

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

Gly

10  
 <210> 8  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40-gL1

20  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

<400> 8

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

gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

gta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa gcc ctc atc 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45

tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga 192  
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc acg atc agt agc ctc cag cca 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
 85 90 95

aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

25  
 <210> 9  
 <211>107  
 <212>PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

ES 2 707 714 T3

<400>9

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

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

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

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

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

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

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

<210>10

<211> 321

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: hTNF40-gL2

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

20 <400>10

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

gac cgg gtc acc atc act tgt aaa gcc agt cag aac gta ggt act aac 96  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

gta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa ctc ctc atc 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga 192  
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc acg atc agt agc ctc cag cca 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc 288  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
85 90 95

aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa 321  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

ES 2 707 714 T3

<210> 11  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 11

10

```

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

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

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

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

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

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

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

15

<210> 12  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: gh1hTNF40.4

25

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

<400> 12

```

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

ES 2 707 714 T3

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 13  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 13

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 Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15

<210> 14  
 <211> 354  
 <212> AND  
 <213> Secuencia Artificial

20

# ES 2 707 714 T3

<220>

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

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(354)

<400> 15

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

<210> 15  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Construcción Sintética

20

<400> 15

# ES 2 707 714 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 16  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH1  
<400> 16

atgaaatgca gctgggtcat sttct 26

15 <210> 17  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH2  
<400> 17

25 atgggatgga gctratcat syttct 26

30 <210> 18  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH3  
35 <400> 18

atgaagwtgt ggtaaactg ggttt

<210> 19  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH4  
 <400> 19  
 10  
 atgracttg ggytcagctt grt 23  
 <210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH5  
 20  
 <400> 20  
 atggactcca ggctcaattt agtttt 26  
 25  
 <210> 21  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH6  
 <400> 21  
 35  
 atggctgtsy trsgctrct ctctg 26  
 <210> 22  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH7  
 45  
 <400> 22  
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 26  
 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH8  
 55  
 <400> 23  
 atgagagtgc tgattctttt gtg 23  
 60  
 <210> 24

# ES 2 707 714 T3

<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH9

<400> 24

10 atggmtggg tgggamctt gctatt 26

<210> 25  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:extremo CH10

20 <400> 25

atgggcagac ttacatttc attcct 26

<210> 26  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH11

<400> 26

30 atggatttg ggctgattt tttattg 28

<210> 27  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CH12

40 <400> 27

45 atgatggtg taagtctct gtacct 26

<210> 28  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial: terminación cebador 5'

<400> 28

55 gcgcgaagc ttccgccac c 21

60 <210> 29  
<211> 29

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL1  
  
 <400> 29  
  
 10 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29  
  
 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL2  
  
 <400> 30  
  
 20 atggagwcag acacactcct gytatgggt 29  
  
 <210> 31  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL3  
  
 30 <400> 31  
  
 atgagtggtgc tctactcaggt cct 23  
  
 35 <210> 32  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL4  
  
 <400> 32  
  
 45 atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26  
  
 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL5  
  
 55 <400> 33  
 atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29  
  
 <210> 34  
 <211> 29  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL5A  
  
 <400> 34  
 5 atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29  
  
 <210> 35  
 <211> 26  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL6  
 15 <400> 35  
  
 atgaggtkcy ytytsagyt yctgrg 26  
 20 <210> 36  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL7  
  
 <400> 36  
 30 atgggcwtca agatggagtc aca 23  
  
 <210> 37  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL8  
 40 <400> 37  
  
 atgtggggay ctkttycmm ttttcaat 29  
 45 <210> 38  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL9  
  
 <400> 38  
  
 atggtrtccw casctcagtt cctt 24  
 55 <210> 39  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL10

<400> 39

5 atgtatatat gttgtgtgc tatttc 26

<210> 40  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL11

<400> 40

15 atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 41  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL12A

25 <400> 41

atragtywc agaccaggt ctyrt 26

30 <210> 42  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL12B

<400> 42

40 atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 43  
 <211> 26  
 <212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL13

50 <400> 43

atggattcac aggcccaggt tcttat 26

55 <210> 44  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL14

<400> 44

atgatgagtc ctgcccagtt cctggt 26

5 <210> 45  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL15

<400> 45

15 atgaatttgc ctgttcacatct ctgggtgct 29

<210> 46  
<211> 29  
<212> AND  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: primer CL16

<400> 46

25 atggatttcc aattggtcct catctcctt 29

<210> 47  
<211> 26  
<212> AND  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: primer CL17A

35 <400> 47

atgaggtgcc tarcttsagtt cctgrg 26

40 <210> 48  
<211> 26  
<212> AND  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: primer CL17B

<400> 48

50 atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

<210> 49  
<211> 26  
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL17C

60 <400> 49

	atgaggcatt ctctcaatt ctggg	26
5	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:extremo 5' del cebador  <400> 50	
15	ggactgttcg aagccgccac c	21
20	<210> 51 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador CL12  <400> 51	
25	ggatacagtt ggtgcagcat cgtacgtt	30
30	<210> 52 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador R2155  <400> 52	
35	gcagatgggc ccttcgtga ggctgmrqag acdgtga	37
40	<210> 53 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador R1053  <400> 53	
45	gctgacagac taacagactg ttcc	24
50	<210> 54 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador R720  <400> 54	
55		
60	gctctcggag gtgctcct	18

ES 2 707 714 T3

<210> 55  
<211> 70  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7982

10 <400> 55

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg 60  
talcagcaaa 70

<210> 56  
<211> 71  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7983

<400> 56

atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctgggt tttgctgata 60  
ccaggctacg t 71

25 <210> 57  
<211> 71  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7984

<400> 57

35 tacagtgcct ctttctctta tagtggtgta ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggt 60  
actgatttca c 71

<210> 58  
<211> 71  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7985

45 <400> 58

gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60  
taccactacc g 71

50 <210> 59  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7986

# ES 2 707 714 T3

<400> 59

atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctaccc actcacattc ggtcagggta 60  
ctaaagtaga aatcaaacgt acggaattc 89

5

<210> 60  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7981

<400> 60

15

gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 61  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido P7980

25

<400> 61

gaattccgta cgtttgattt ctacttagt 30

30

<210> 62  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido R1053

<400> 62

40

gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 63  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido R5350

50

<400> 63

tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

55

<210> 64  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido R5349

ES 2 707 714 T3

<400> 64

5 gcagatggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 65  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:oligonucleótido R684

15 <400> 65

ttcaactgct catcagat 18

20 <210> 66  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7989

<400> 66

gaagcaccag gcttcttaac ctctgctcct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60  
aattc 65

30 <210> 67  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7990

<400> 67

40 ggттааgааg cctggtgctt ccgtcaaagt ttctgtgtaag gcctcaggct acgtgttcac 60  
agactatggt a 71

45 <210> 68  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7991

50 <400> 68

ccaaccatc catttcaggc cttgtcccgg ggctgcttg acccaattca taccatagtc 60  
tgtgaacacg t 71

55 <210> 69  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 707 714 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7995

5 <400> 69

ggcctgaaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60  
ttcaaggga gattcacgtt c 81

<210> 70

10 <211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7992

<400> 70

ccatgtatgc agtgcgttg ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc ctgaa 56

20

<210> 71

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7993

<400> 71

30

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60  
at 62

<210> 72

<211> 78

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7994

40

<400> 72

gaattcggta cctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 73

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7988

<400> 73

50

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc

30

ES 2 707 714 T3

<210> 74  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7987

<400> 74

10 gaattcgga ccctggccc agtagtccat 30

<210> 75  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7999

20

<400> 75

gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60  
aattc 65

25

<210> 76  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P8000

<400> 76

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtctgtgct gcatctgggt acgtcttcac 60  
agactatgga a 71

35

<210> 77  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P8001

45

<400> 77

ccaaccatc catttcaggc cctttcccg ggcctgctta acccaattca ttccatagtc 60  
tgtgaagacg t 71

50

<210> 78  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7997

<400> 78

ES 2 707 714 T3

ggaggtatgc tgtgactg gatgtgcta gagagaacgt gaatctgcc ttgaa 55

5 <210> 79  
<211> 62  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7998

<400> 79

15 ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60  
at 62

20 <210> 80  
<211> 78  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7993

<400> 80

30 gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60  
gtacactgcg gtgtcctc 78

35 <210> 81  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:cebador P7996

40 <400> 81

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

45 <210> 82  
<211> 74  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial: 5' cebador

<400> 82

55 cgcgcggcaa ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcgaagc tgacattcaa 60  
atgaccacaga gcc 74

<210> 83  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 707 714 T3

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

<400> 83

5 ttcaactgct catcagatgg 20

<210> 84

<211> 78

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

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

15 <400> 84

gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttcgccacog tggcgcaagc tgaggttcag 60  
ctggtcgagt caggaggc 78

<210> 85

20 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia artificial: 3' cebador

<400> 85

gcctgagttc cacgacac

30 18

<210> 86

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: región estructural L1 en consenso para grupo 1 humano

<400> 86

40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 87

45 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: región estructural L1 para hTNF-40

50

<400> 87

# ES 2 707 714 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys  
20

5 <210> 88  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L2 en consenso para grupo 1 humano

<400> 88

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

15 <210> 89  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L2 para hTNF

<400> 89

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

25 <210> 90  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L3 en consenso para grupo 1 humano

35 <400> 90

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

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

40 <210> 91  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L3 para hTNF-40

<400> 91

ES 2 707 714 T3

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

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

5 <210> 92  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
10 <223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L4 en consenso para grupo 1 humano  
  
<400> 92

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

15 <210> 93  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural L4 para hTNF-40  
  
<400> 93

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

25  
  
30 <210> 91  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H1 en consenso para grupo 1 humano  
  
35 <400> 94

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

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

40 <210> 95  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H1 para hTNF-40  
  
<400> 95

# ES 2 707 714 T3

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

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

5 <210> 96  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H2 en consenso para grupo 1 humano

<400> 96

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

15 <210> 97  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H2 para hTNF-40

<400> 97

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

25 <210> 98  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H3 en consenso para grupo 1 humano

35 <400> 98

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

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

40 <210> 99  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H3 para hTNF-40

<400> 99

# ES 2 707 714 T3

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

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

- 5 <210> 100  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H4 en consenso para grupo 1 humano
- <400> 100
- Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10
- 15 <210> 101  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H4 para hTNF-40
- <400> 101
- Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
1 5 10
- 25 <210> 102  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Mus musculus
- 30 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(324)  
<223> dominio variable de la cadena ligera de hTNF40 en ratón
- 35 <400> 102

ES 2 707 714 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 103  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 103

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

10

<210> 104  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

15

ES 2 707 714 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

5 <223> dominio variable de la cadena pesada de hTNF40 en ratón

<400> 104

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

<210> 105

<211> 118

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 105

ES 2 707 714 T3

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ala Phe Lys Trp Met  
 35 40 45

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 106  
 <211> 84  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: adaptador de oligonucleótido OmpA

15 <400> 106

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

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

20 <210> 107  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Construcción Sintética

ES 2 707 714 T3

<400> 107

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala  
 1 5 10

5 <210> 108  
 <211> 67  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: IGS cassette-1

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (2)..(40)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (43)..(66)

20 <400> 108

g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga gga gag tgt ta atg aag 48  
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Met Lys  
 1 5 10 15

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

25 <210> 109  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 109

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

35 <210> 110  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Construcción Sintética

45 <400> 110

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile  
 1 5

50 <210> 111  
 <211> 69  
 <212> AND

ES 2 707 714 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:Cassette-1 de IGS

5

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(43)

10

<220>

<221> CDS

<222> (45)..(68)

<400> 111

15

```

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

```

aag aag act gct ata gca att g      69
Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 15             20
    
```

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Construcción Sintética

25

<400> 112

```

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  1             5             10
    
```

30

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 113

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
  1             5
    
```

40

<210> 114

<211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:Cassette-2 de IGS

50

<220>

<221> CDS

ES 2 707 714 T3

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

5 <222> (57)..(80)

<400> 114

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

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

10

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 115

20

```
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  1           5           10
```

<210> 116

<211> 8

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

30

<400> 116

```
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
  1           5
```

35

<210> 117

<211> 81

<212> AND

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:Cassette-3 de IGS

<220>

<221> CDS

45

<222> (2)..(43)

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

50

<400> 117

ES 2 707 714 T3

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

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

5 <210> 118  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 118

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

15 <210> 119  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 119

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile  
 1 5

30 <210> 120  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: región estructural H1 en consenso con grupo 3 humano

35 <400> 120

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

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

40 <210> 121  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 707 714 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:región estructural H2 en consenso con grupo 3 humano

<400> 121

5

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

<210> 122

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H3 en consenso con grupo 3 humano

15

<400> 122

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

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

20

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:región estructural H4 en consenso con grupo 3 humano

<400> 123

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

30

<210> 124

<211> 648

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Grafted Heavy Chain

40

<400> 124

ES 2 707 714 T3

```

gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggc ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg      60
tctctgtctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc      120
ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat      180
gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac      240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac      300
agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc      360
accaagggcc catcggctct cccctctgca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca      420
gcggcctctg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggc gtcgtggaac      480
tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcttacagtc ctcaggactc      540
tactcctca  gcagcgtggc gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacac      600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt      648

```

<210> 125  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<223> Grafted Heavy Chain

10

<400> 125

```

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

```

ES 2 707 714 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 210 215

<210> 126  
 <211> 642  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera injertada

ES 2 707 714 T3

<400> 126

```

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

```

5

<210> 127  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Cadena ligera injertada

15

<400> 127

```

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 707 714 T3

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 128  
 <211> 687  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena pesada injertada

<400> 128

gaggttcagc tggtcgagtc aggagggcggc ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60

tctctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120

ccgggaaagg gcctggaatg gatggggttgg attaatactt acattggaga gcctatztat 180

gctgacagcg tcaagggcag attcaegttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240

ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300

agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctcagcttcc 360

accaagggcc catcggctct ccccttgga cccctctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggc gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcttacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggctcgaca agaaagttga gccc aaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 687

<210> 129  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Cadena pesada injertada  
  
<400> 129

ES 2 707 714 T3

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

ES 2 707 714 T3

195

200

205

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

His Thr Cys Ala Ala  
225

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad por el TNF $\alpha$  humano, que es un fragmento Fab caracterizado por que comprende una cadena ligera que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 111.
- 5 2. Un anticuerpo que tiene especificidad por el TNF $\alpha$  humano, que es un fragmento Fab caracterizado por que tiene una cadena ligera que tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 113 y una cadena pesada que tiene en la secuencia proporcionada en la SEC ID NO: 111.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que es un fragmento Fab modificaco en donde la modificación es la adición de el del extremo C-terminal de su cadena pesada un grupo derivado uno o más aminoácidospermite la unión de un efector o molécula reportera.
- 10 4. El fragmento Fab modificado de la reivindicación 3, en donde el ácido adicional for,a una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína al que el efector o molécula reportera puede estar unida .
5. Un ADN que codifica la cadena pesada y ligera de la molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab de la reivindicación 1 o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4..
- 15 6. El ADN de la reivindicación 5 que comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:110 y 112.
7. Un vector de clonación o expresión que contiene el ADN de la reivindicación 5 o 6, el vector de expresión opcionalmente siendo un vector de expresión de E coli.
8. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 7, o un primer vector que codifica la cadena ligera de un fragmento Fab de la reivindicación q o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4 y un segundo vector que codifica la cadena pesada de un fragmento Fab de la reivindicación 1 o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4.
- 20 9. Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo que es un fragmento de la reivindicación 1 o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 y aislar la molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab o fragmento Fab modificado.
- 25 10. Un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab de la reivindicación 1 o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4, que comprende cultivar E coli que comprende un vector de expresión de E coli de la reivindicación 7 y airlar la molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab o un fragmento Fab modificado.
- 30 11. El procedimiento para la producción de moléculas de anticuerpo que es un fragmento Fab o fragmento Fab modificado de la reivindicación 10, en donde la molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab o fragmento Fab modificado está dirigido al periplasma.
12. Una composición terapéutica que comprende la molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab de la reivindicación 1 o 2 o un fragmento Fab modificado de la reivindicación 3 o 4.
- 35 13. La molécula de anticuerpo que es un fragmentp Fab de la reivindicación 1 o 2, o un fragmento Fab modificado de la reivindicaciones 3 o 4, que tiene especificidad por TNF $\alpha$  humana para uso en tratar un tratar un trastorno inmunitario o inmunorregulador agudo o crónico, una infección, una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad maligna.
14. La molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab o fragmento Fab modificado de la reivindicación 13 o para uso en el tratamiento de un transtorno autoinmune o inflamatorio.
- 40 15. La molécula de anticuerpo que es un fragmento Fab o fragmento Fab modificado de la reivindicación 14, para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Crohn o psoriasis.

## FIG. 1

COMPARACIONES DE REGIONES ESTRUCTURALES DE CADENA LIGERA DE ANTICUERPO  
hTNF40 Y SECUENCIAS CONSENSO HUMANAS DEL GRUPO 1

consenso Hu grupo 1	:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 83)
hTNF40	:	DIYMTQSO <u>KEM</u> STSVGDRV <u>SV</u> TC (SEC ID NO: 84)
consenso Hu grupo 1	:	WYQOKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 85)
hTNF40	:	WYQOKPGO <u>SP</u> KALIY (SEC ID NO: 86)
Consenso Hu grupo 1	:	GVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 87)
hTNF40	:	GVPYR <u>FT</u> GSGSGTDFTLTIS <u>TVQ</u> SEDLA <u>EY</u> FC (SEC ID NO: 88)
consenso Hu grupo 1	:	FGQGTKVEIKR (SEC ID NO: 89)
hTNF40	:	FGAGTK <u>LE</u> LKR (SEC ID NO: 90)

## FIG. 3 Secuencia de CDR de hTNF40

H1 DYGMN (SEC ID NO:1)  
H2 WINTYIGEPYVDDFKG (SEC ID NO:7)  
H2' WINTYIGEPYADSVKG (SEC ID NO:2)  
H3 GYRSYAMDY (SEC ID NO:3)  
  
L1 KASQNVGTNVA (SEC ID NO:4)  
L2 SASFLYS (SEC ID NO:5)  
L3 QQYNIYPLT (SEC ID NO:6)

## FIG. 2

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

consenso Hu grupo 1	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	(SEC ID NO: 91)
hTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKI</u> SCKASGYVFT	(SEC ID NO: 92)
consenso Hu grupo 1	: WVRQAPGGLEWGG	(SEC ID NO: 93)
hTNF40	: <u>WVKQAPGKAFKMG</u>	(SEC ID NO: 94)
consenso Hu grupo 1	: RVTITKDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	(SEC ID NO: 95)
hTNF40	: <u>RFAPSLETSASTAFLOINNLK</u> EDTATYFCAR	(SEC ID NO: 96)
consenso Hu grupo 1	: WGQGTLLTVSS	(SEC ID NO: 97)
hTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEC ID NO: 98)
consenso Hu grupo 3	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEC ID NO: 106)
hTNF40	: <u>QIQLVQSGPELKKPGETVKI</u> SCKASGYVFT	(SEC ID NO: 92)
consenso Hu grupo 3	: WVRQAPGKLEWVS	(SEC ID NO: 107)
hTNF40	: <u>WVKQAPGKAFKMG</u>	(SEC ID NO: 94)
consenso Hu grupo 3	: RFTISRDKSKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAR	(SEC ID NO: 108)
hTNF40	: <u>RFAPSLETSASTAFLOINNLK</u> EDTATYFCAR	(SEC ID NO: 96)
consenso Hu grupo 3	: WGQGTLLTVSS	(SEC ID NO: 109)
hTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEC ID NO: 98)

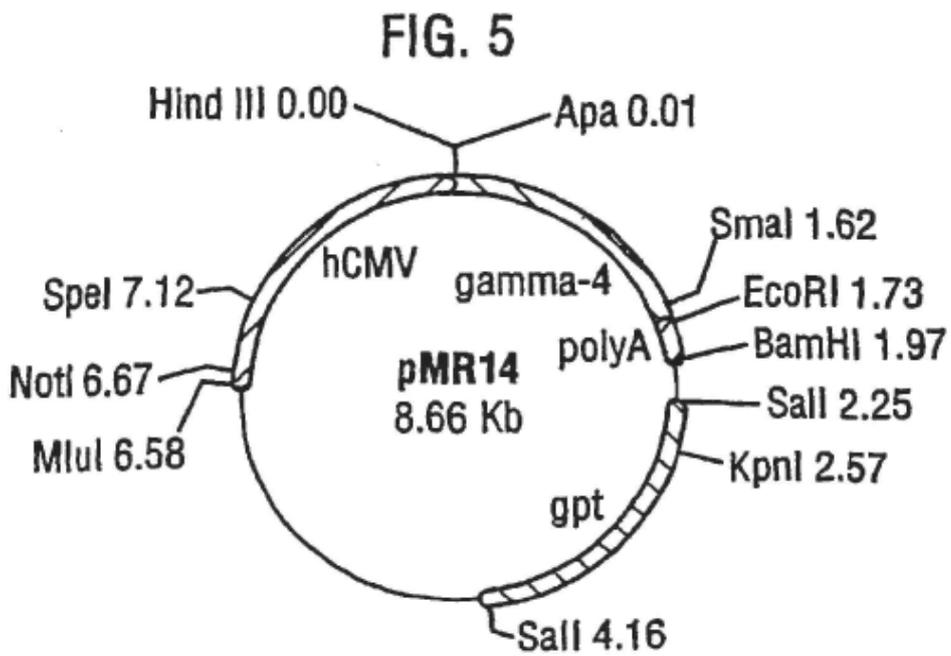
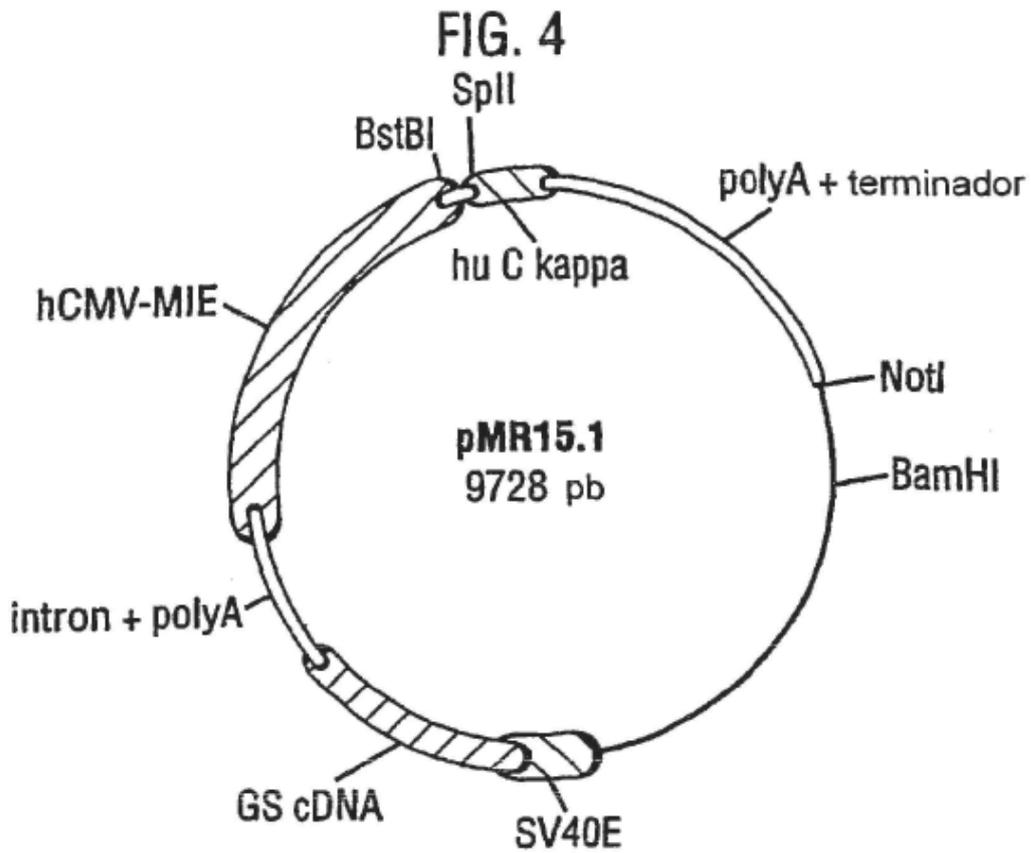


FIG. 6 Secuencia Murina VI de hTNF40 (SEC ID NO: 99)

```

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

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

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

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

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

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

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

```

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

```

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

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

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

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

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

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

```

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

```

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

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

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

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

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

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

```

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

```

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

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

```

FIG. 12

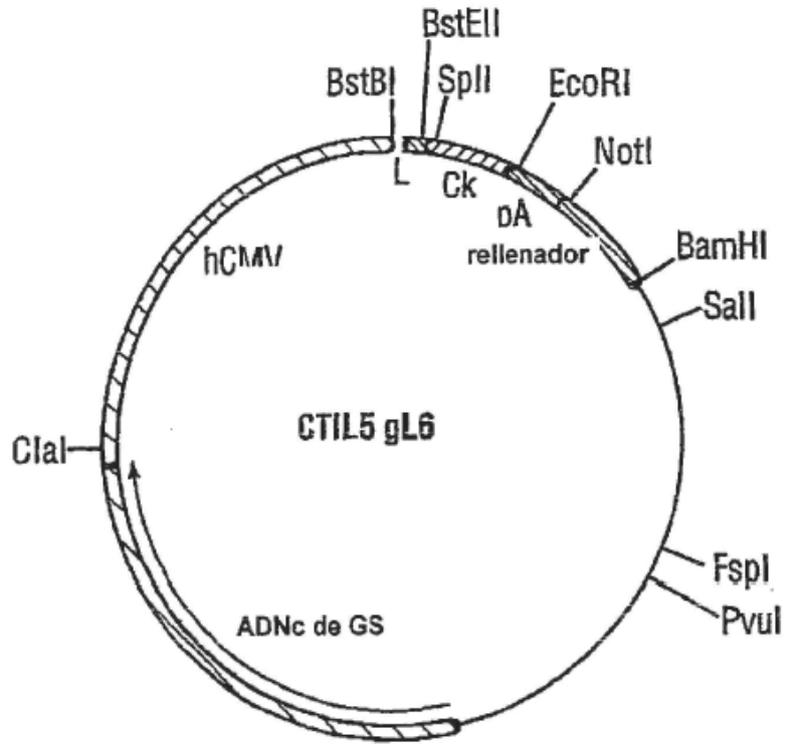
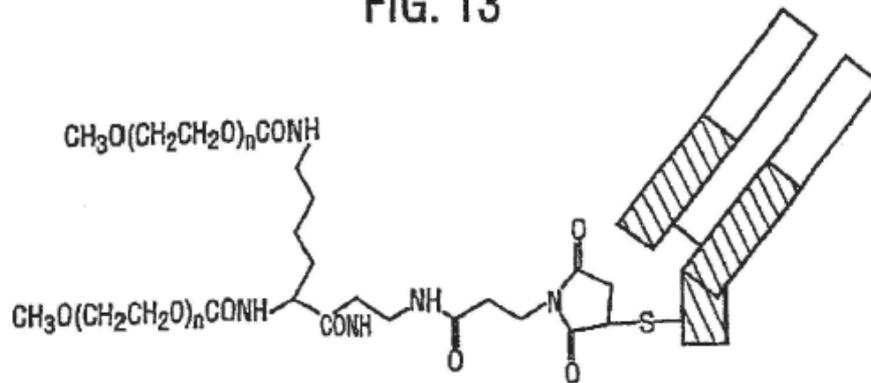


FIG. 13



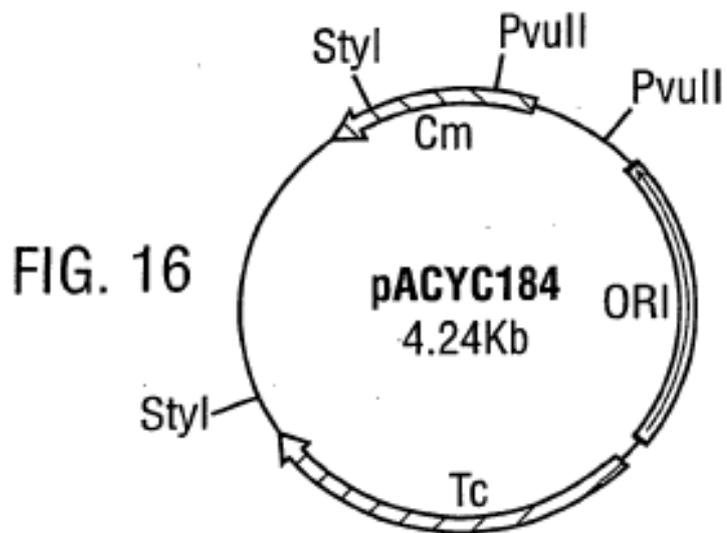
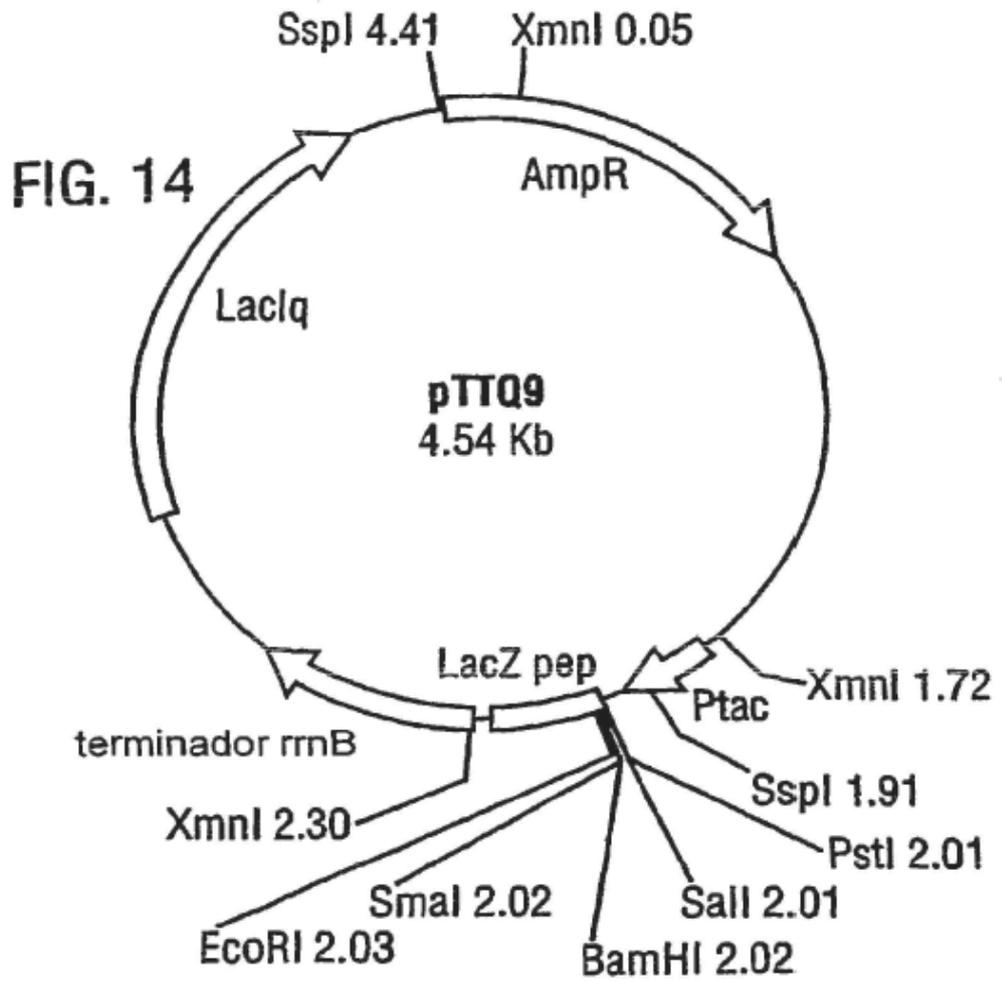
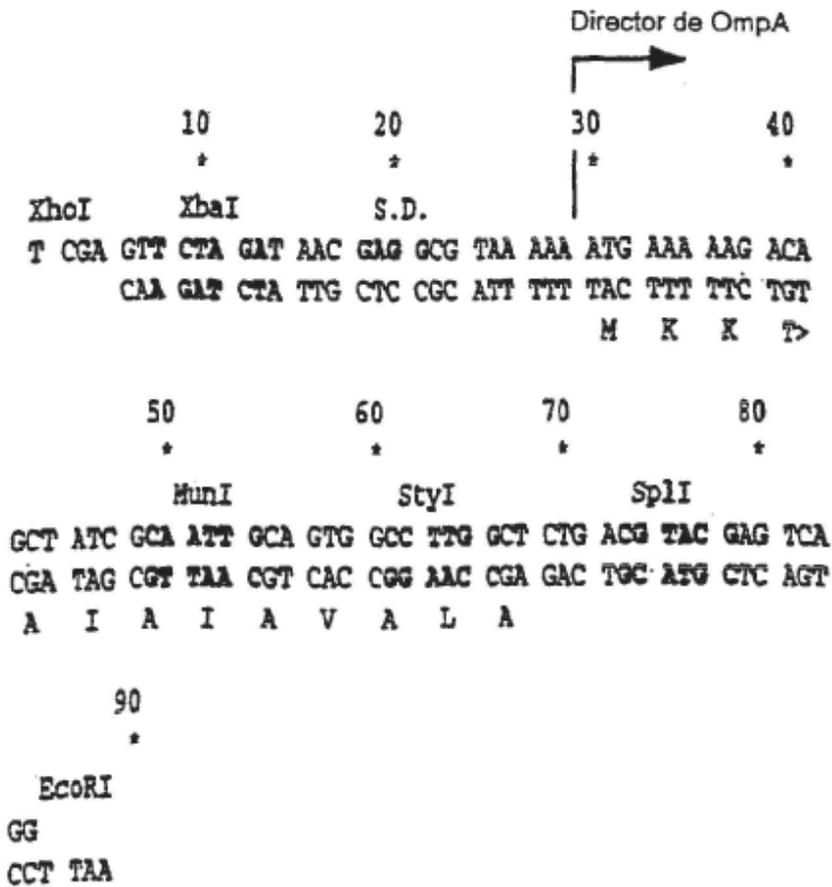


FIG. 15

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



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

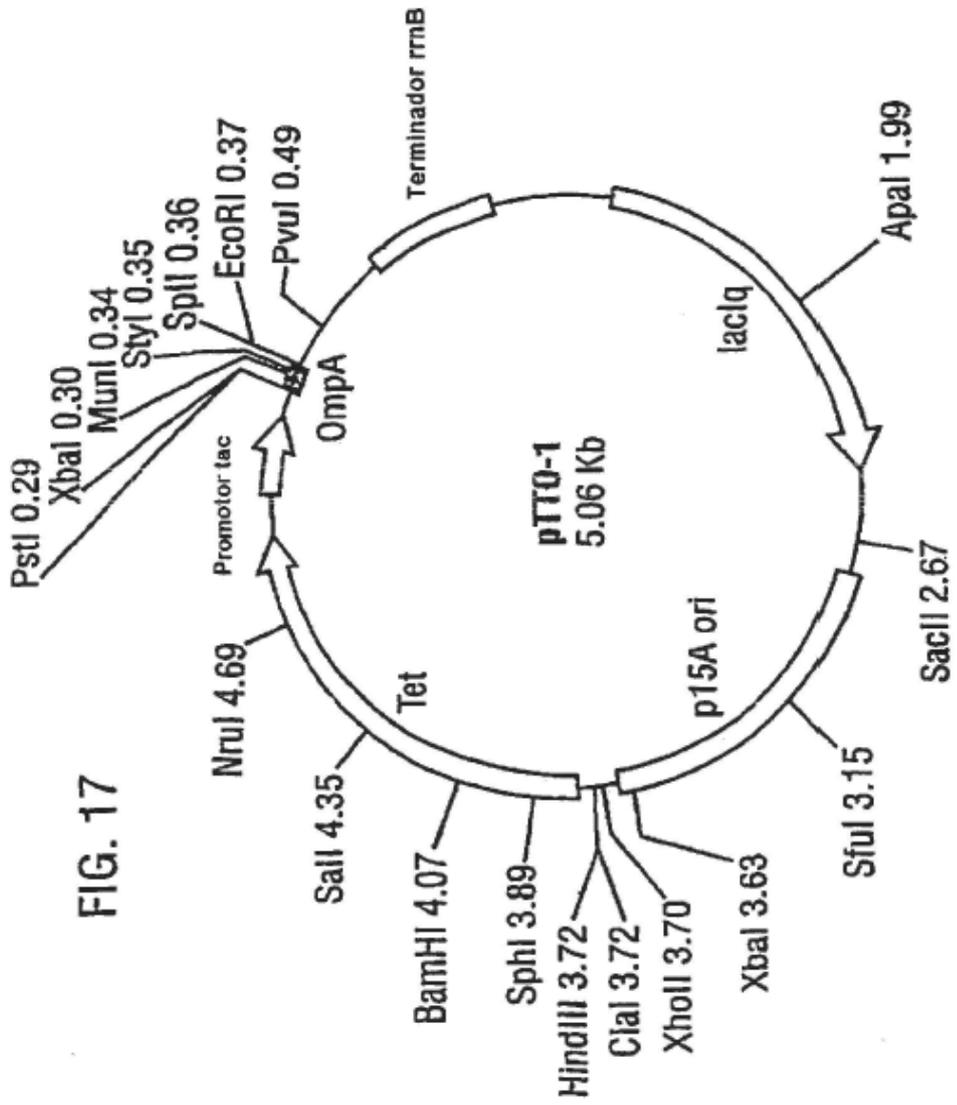


FIG. 17

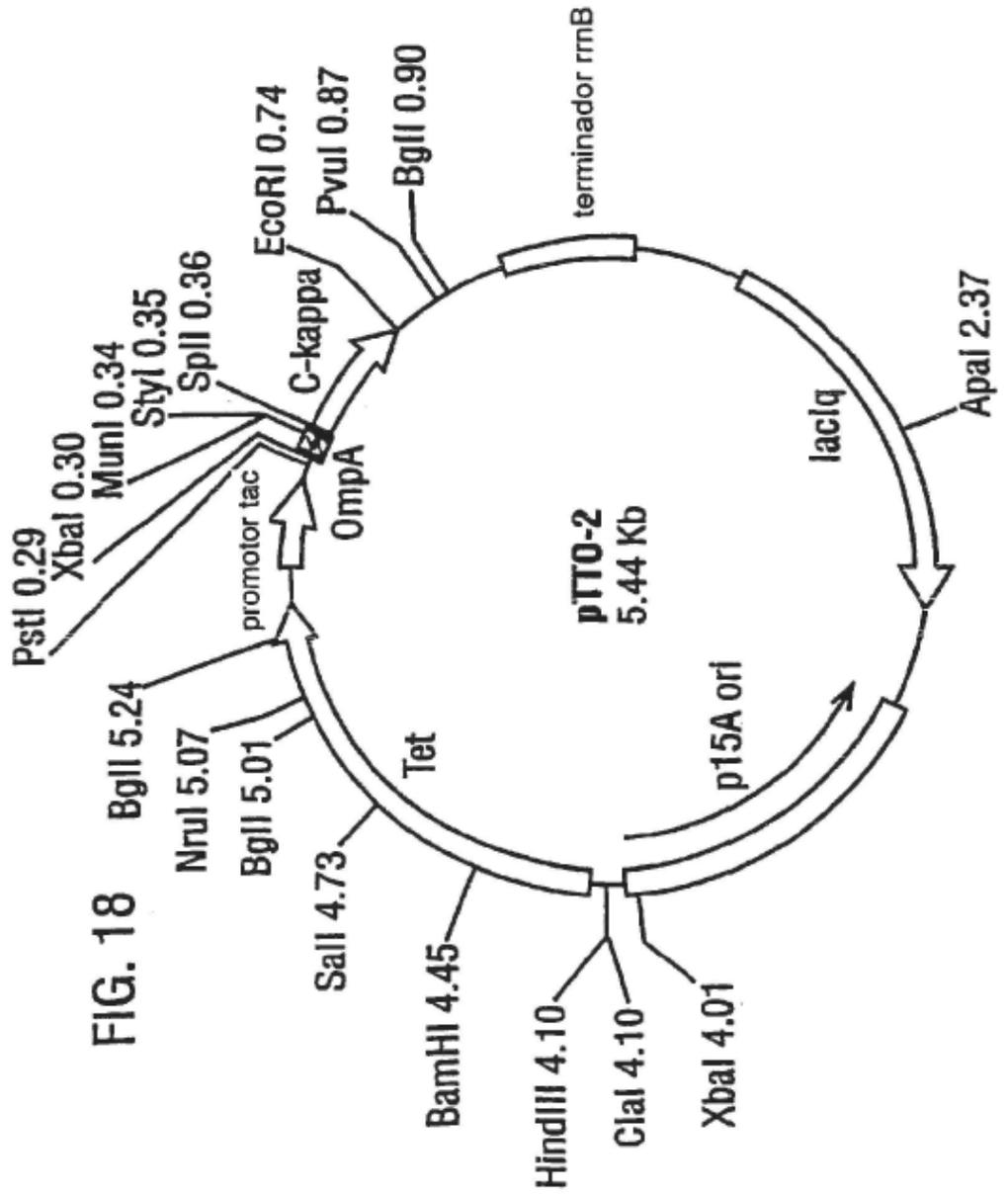
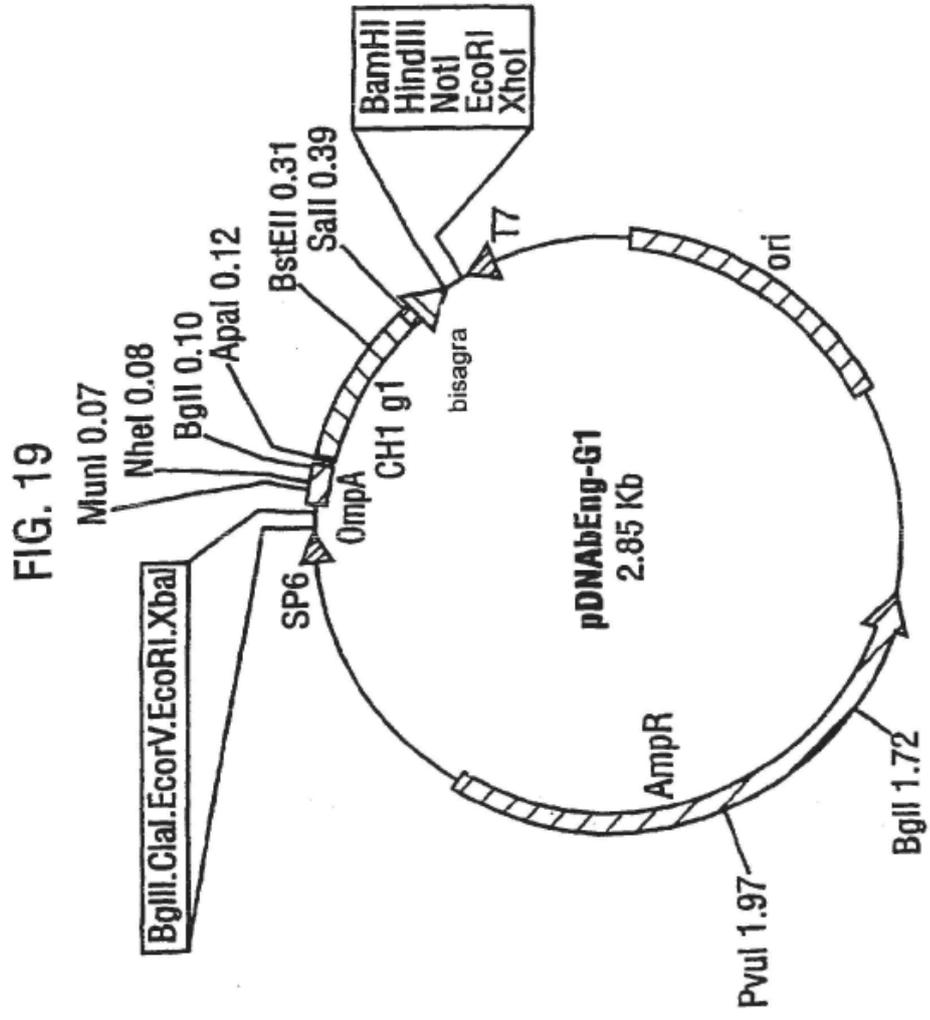


FIG. 18



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

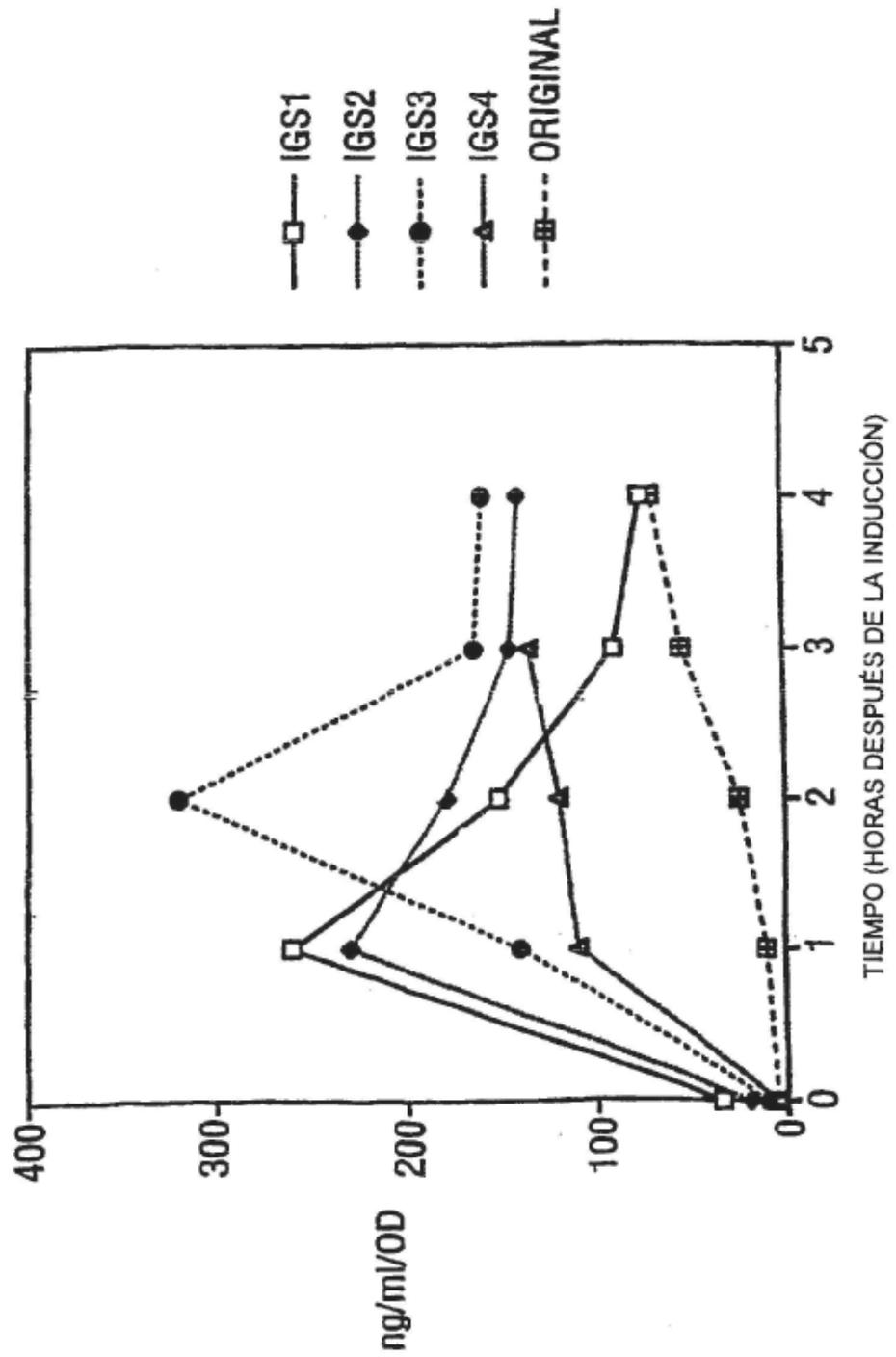
CASSETTE IGS-1 ; Espacio intergénico = -1  
 G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TATG, ANG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 102)  
 S S P V T . K S F N R G E C \* N K K T A I A I  
 Final de la secuencia c-kappa -> Inicio de la secuencia OmpA ->

CASSETTE IGS-2 ; Espacio intergénico = +1  
 G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA ATG, ANG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 103)  
 S S P V T K S F N R G E C \* N K K T A I A I

CASSETTE IGS-3 ; Espacio intergénico = +13  
 G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAATG, ANG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 104)  
 S S P V T K S F N R G E C \* M K K T A I A I

CASSETTE IGS-4 ; Espacio intergénico = +13  
 G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGNGGATATATATG, ANG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 105)  
 S S P V T K S F N R G E C \* M K K T A I A I

FIG. 21 Acumulación periplásmica de Fab' - variantes IGS



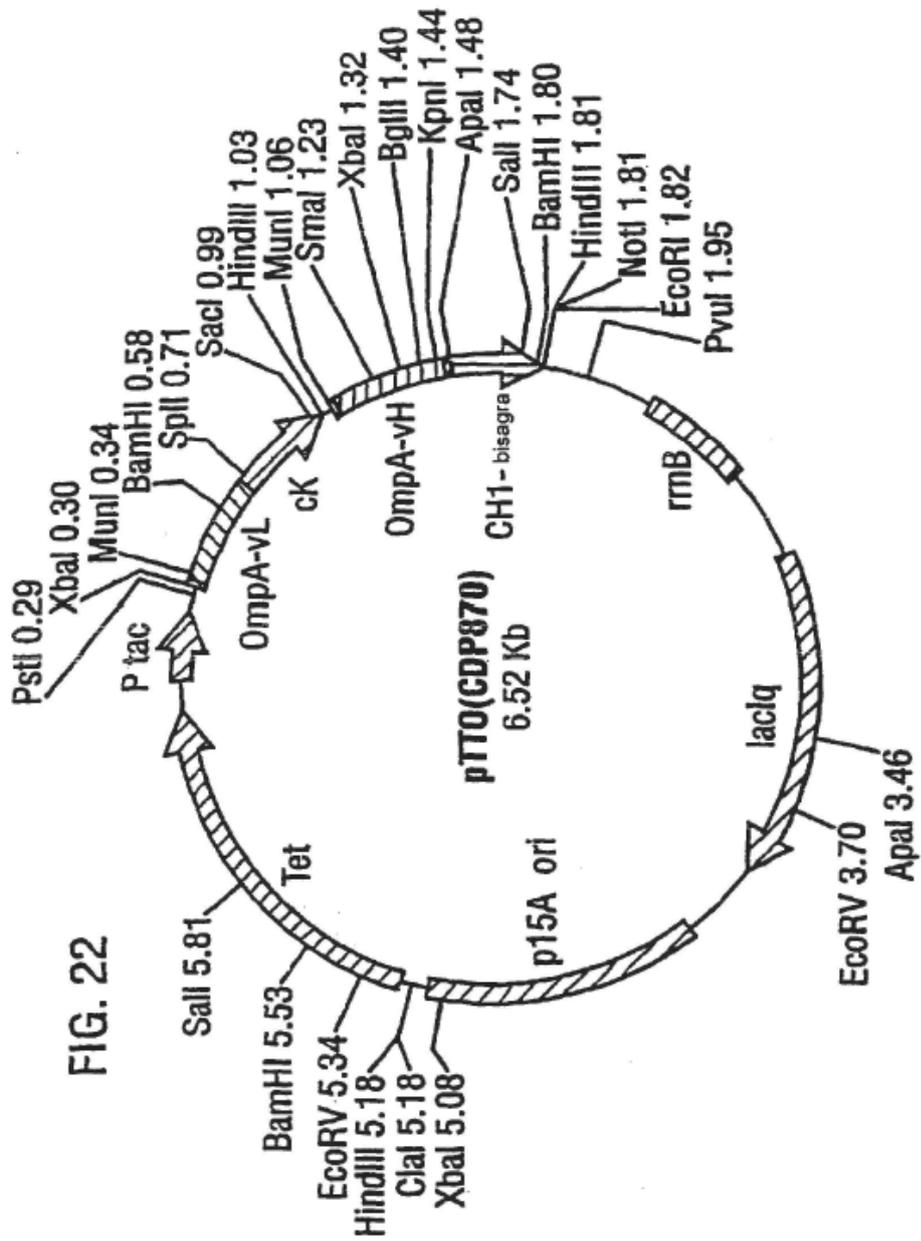


FIG. 22

FIG. 23

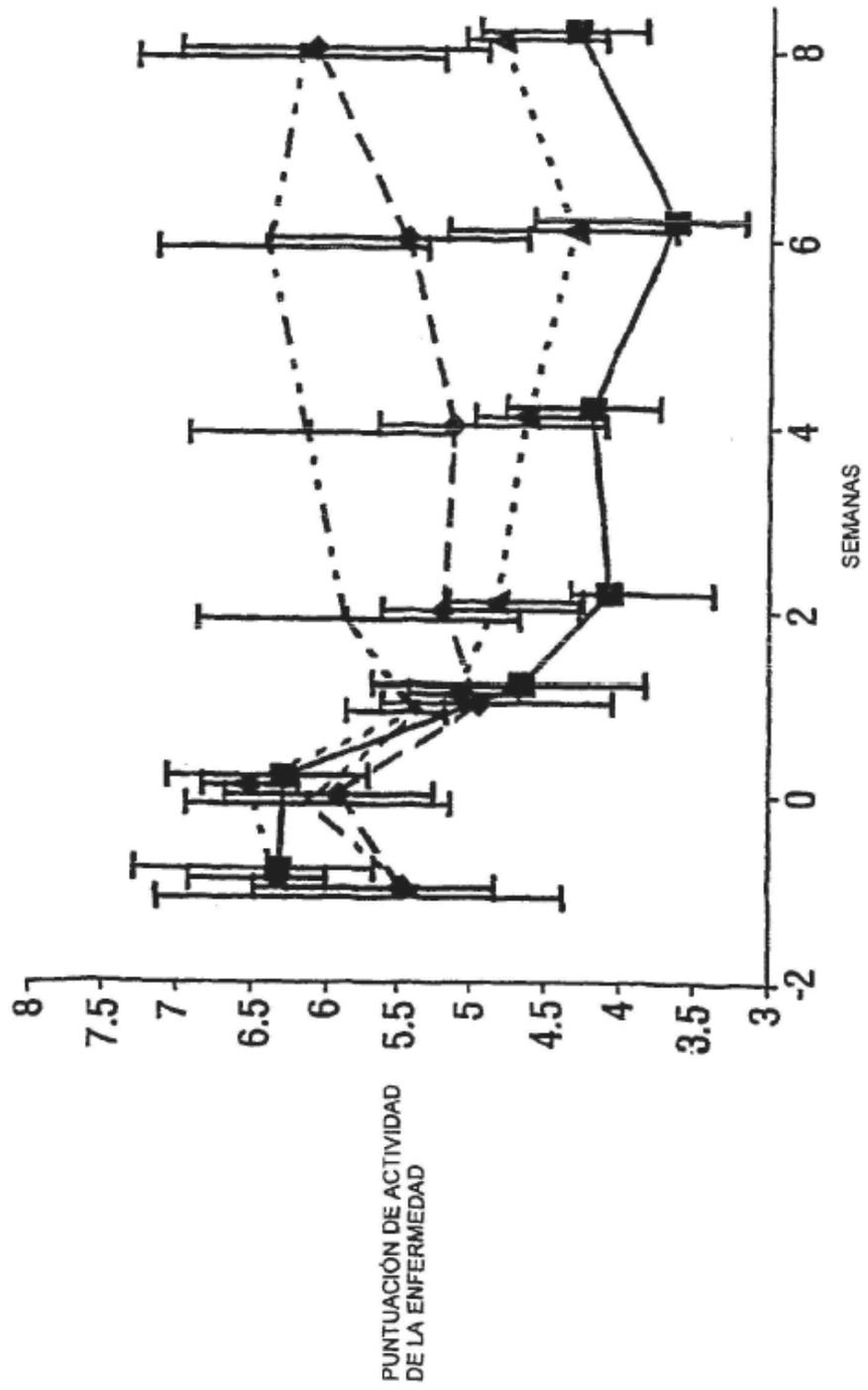


FIG. 24

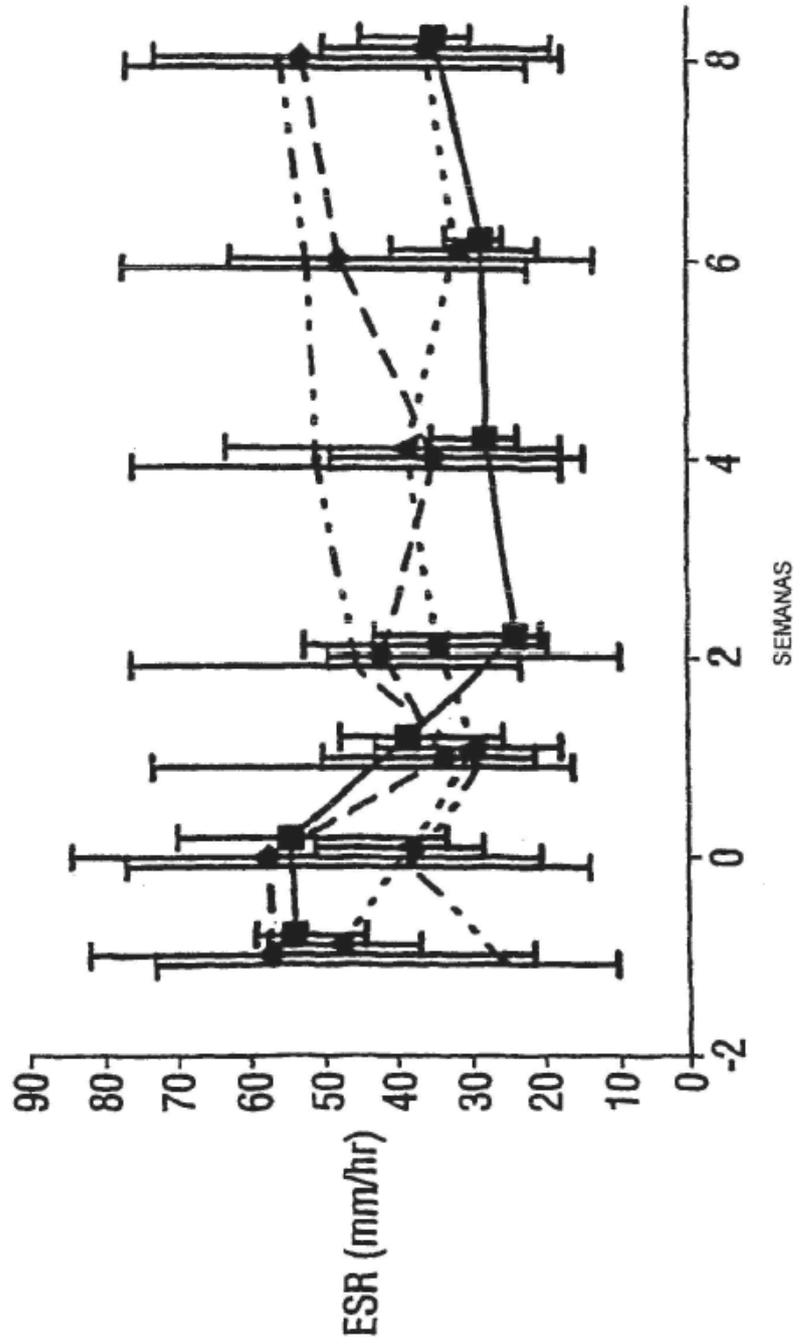


FIG. 24 (Continuación)

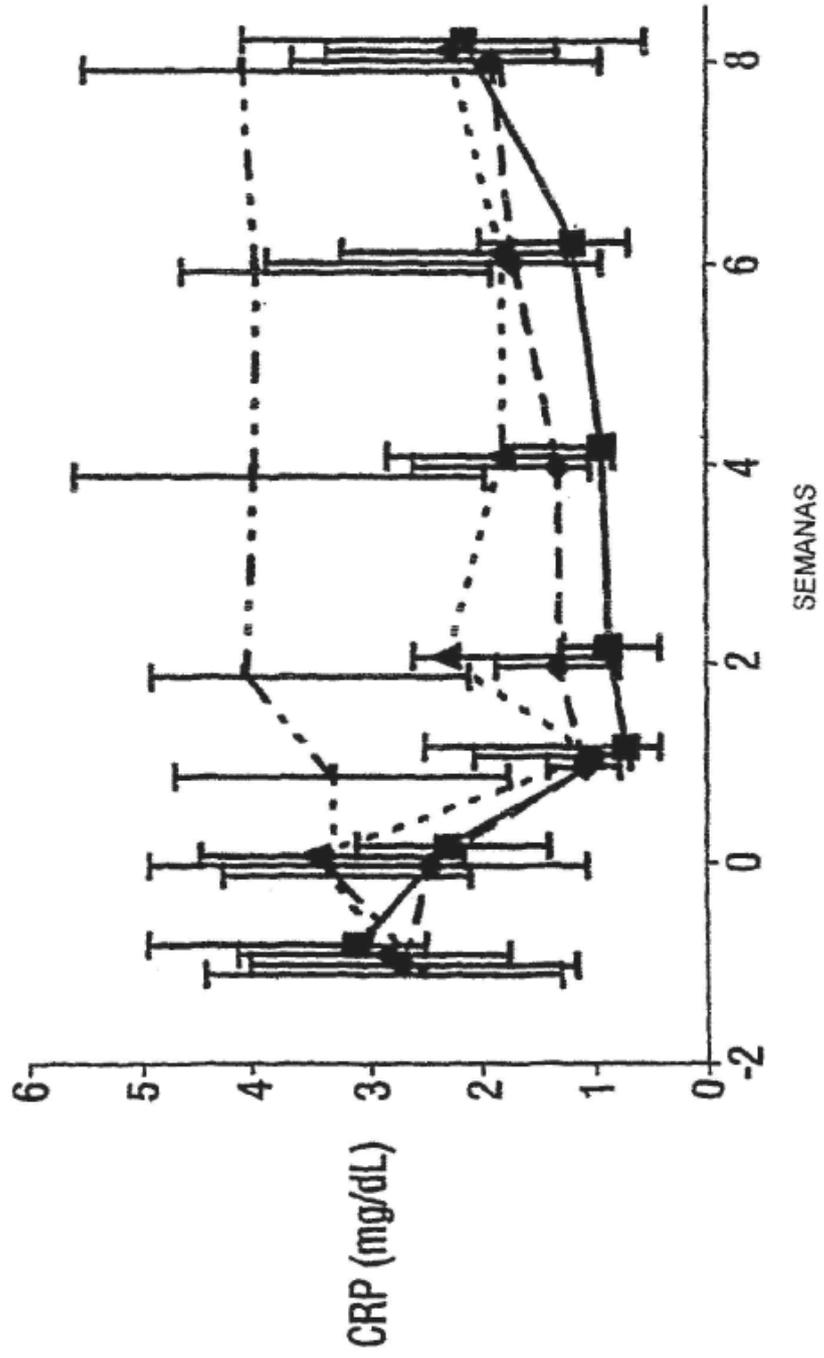


FIG. 24 (Continuación)

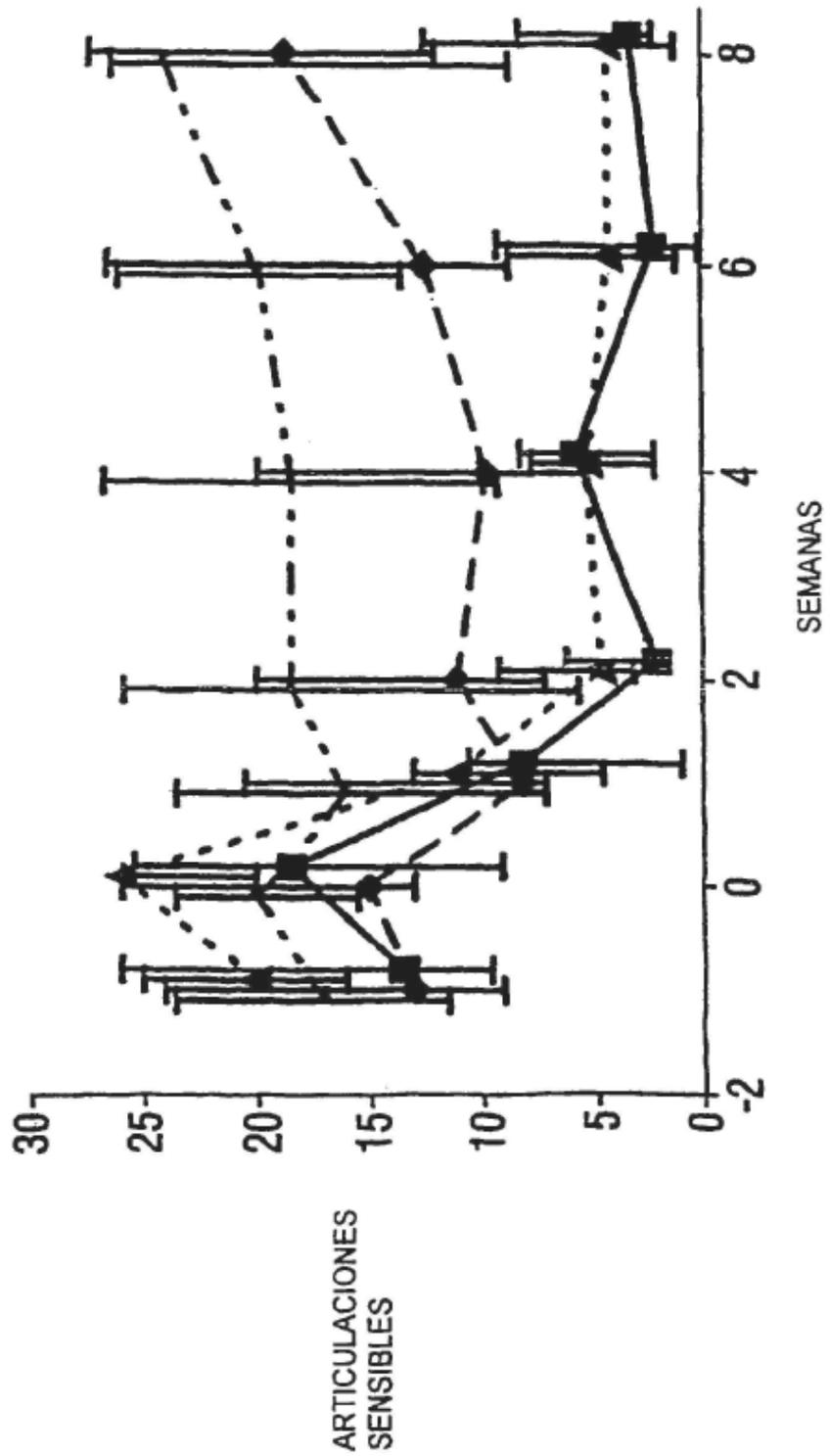


FIG. 24 (Continuación)

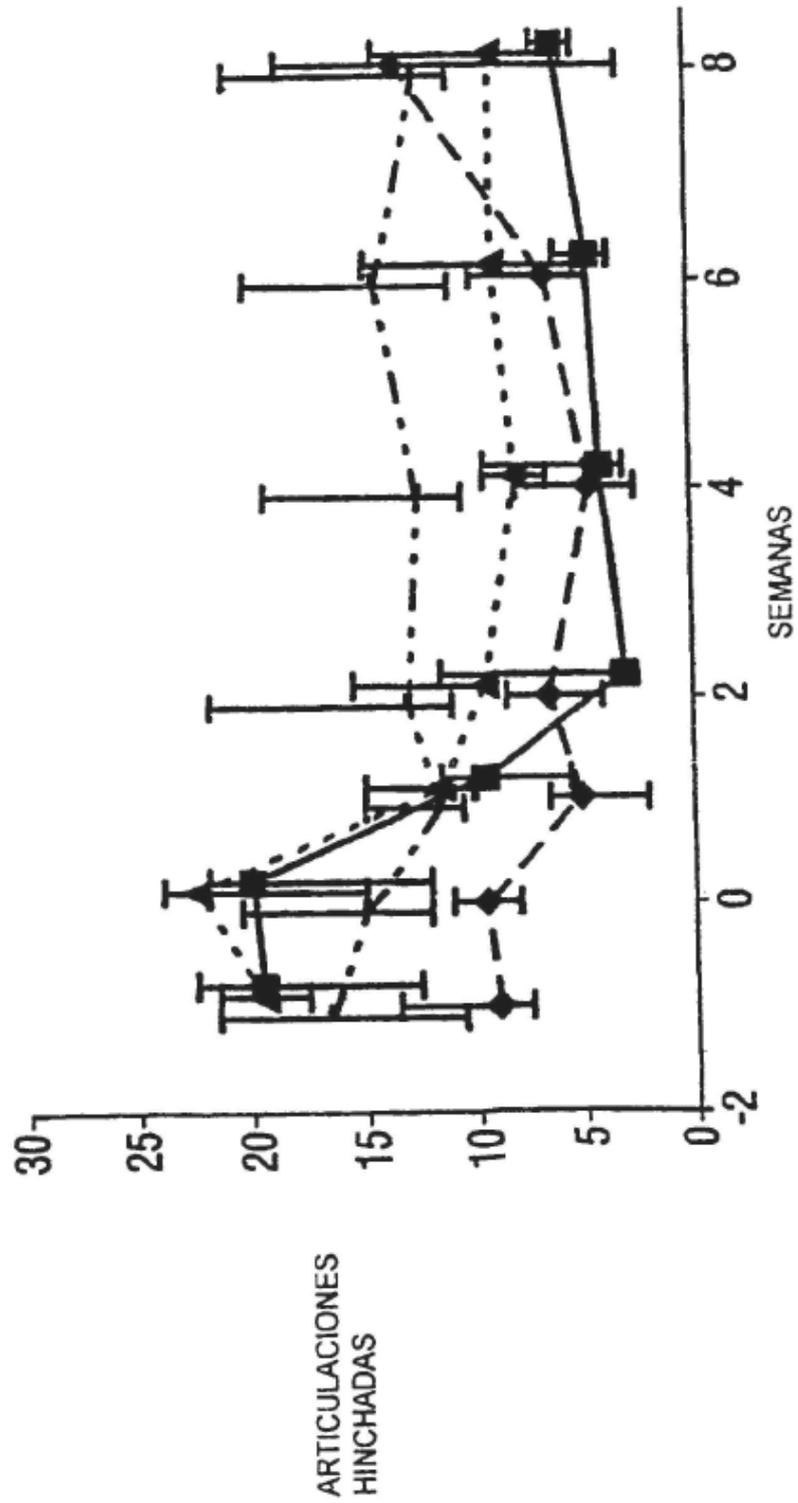


FIG. 24 (Continuación)

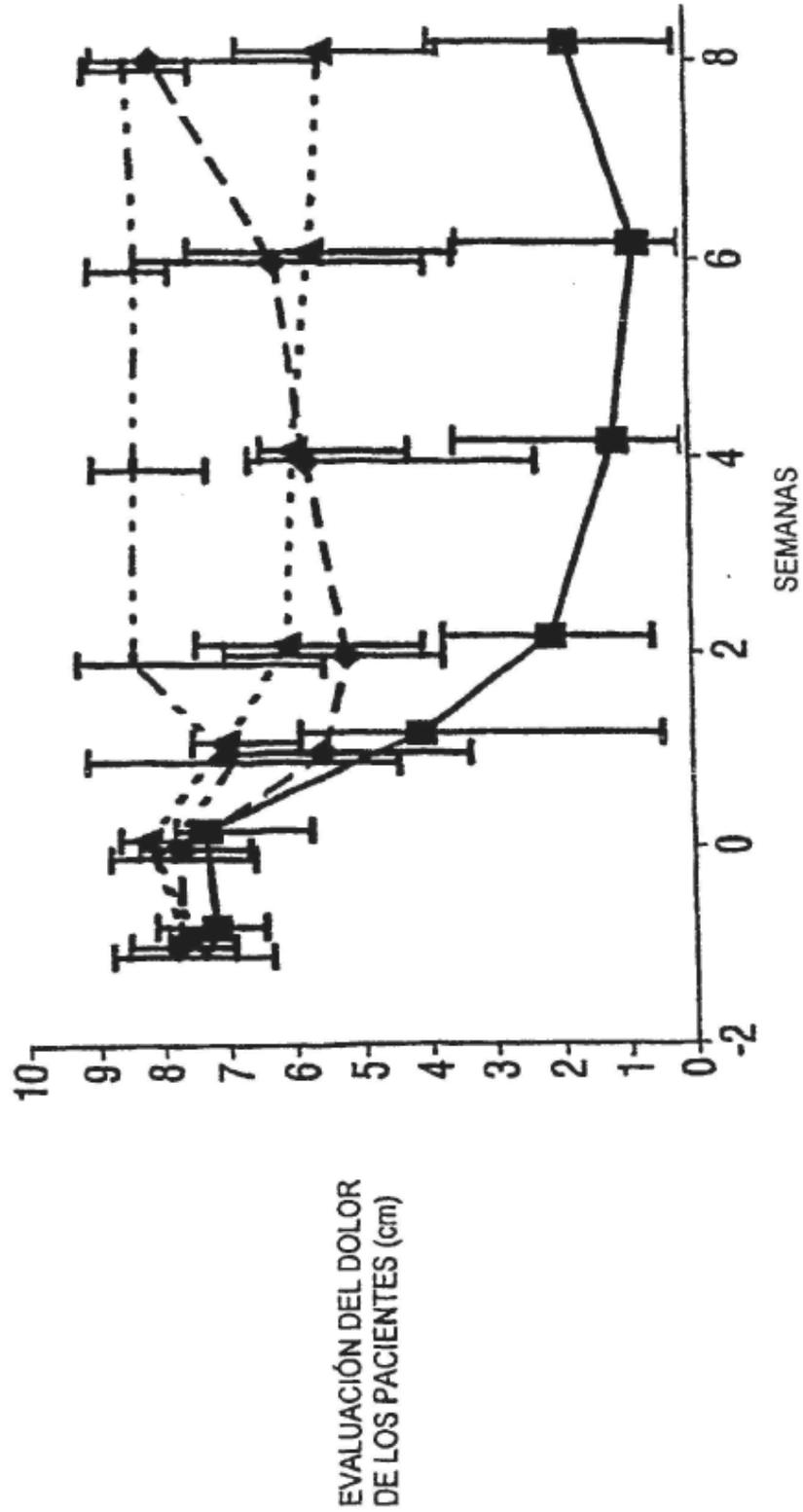


FIG. 24 (Continuación)

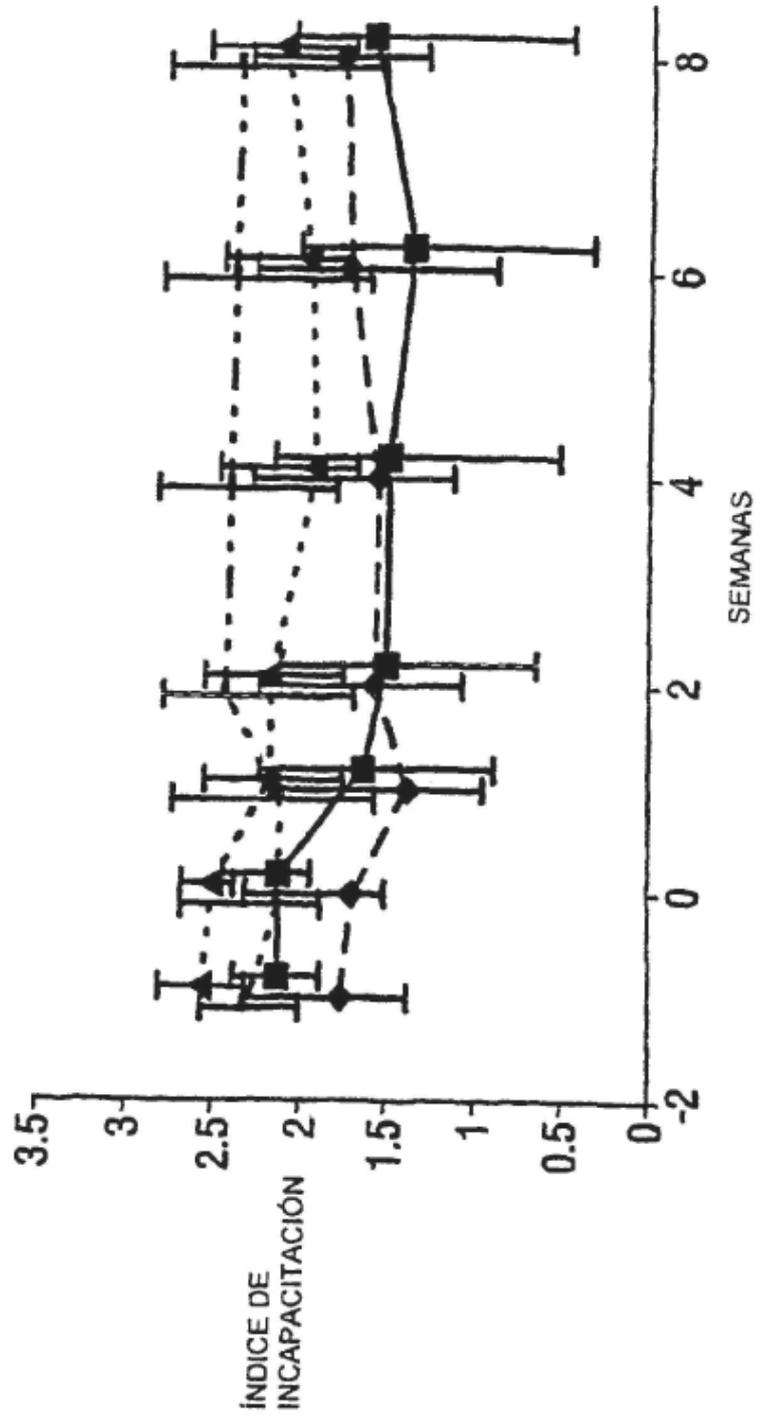


FIG. 24 (Continuación)

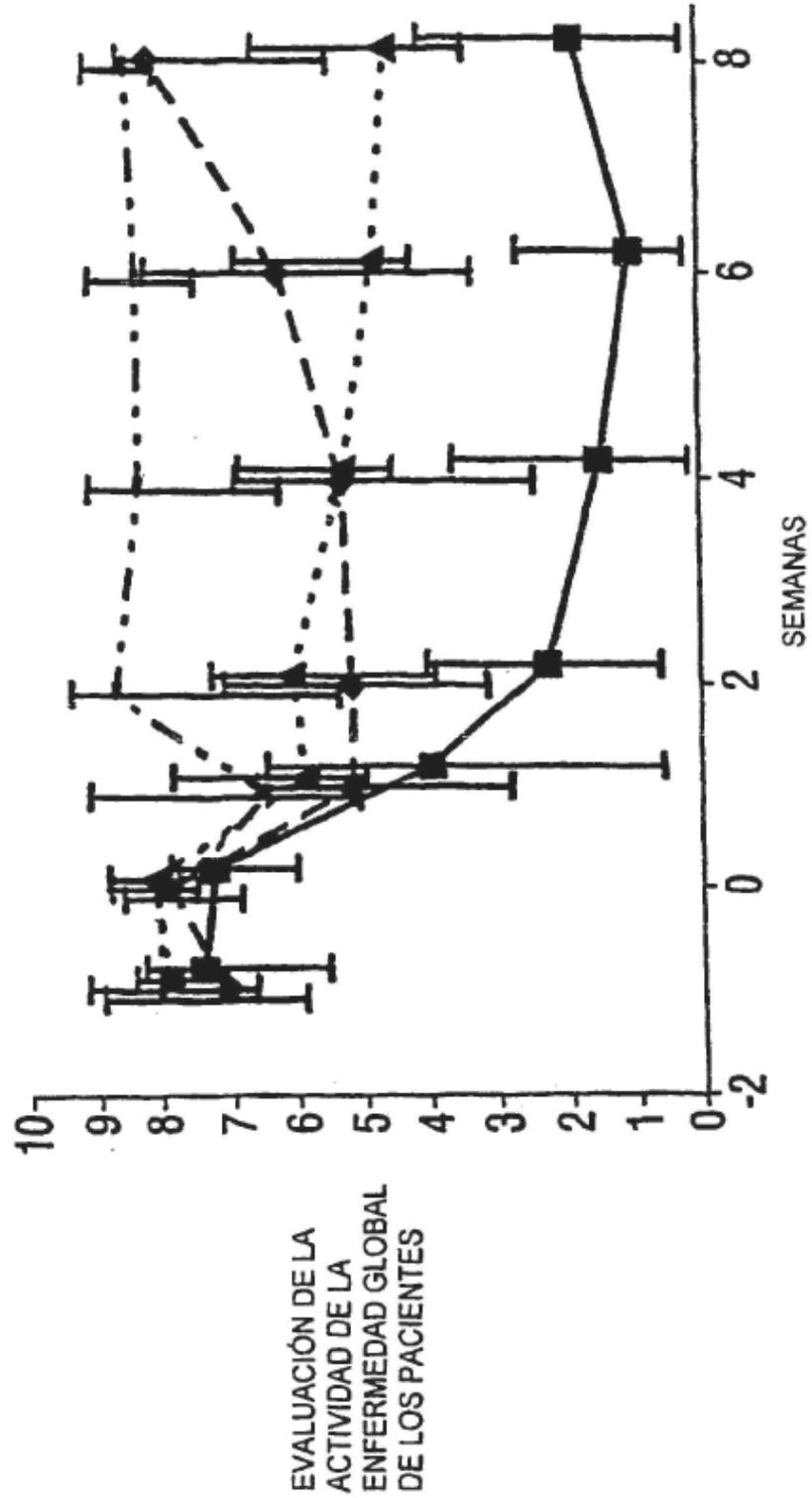


FIG. 24 (Continuación)

