

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-115304-00003-0000

Fecha: 2013-11-08 14:07:10

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 379 FASENACIONALII

Folios: 27

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

Re: PI.-ABBVIE, INC.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13".-Clase C07K 14/00.-Expediente número 13-115.304.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 2 de Julio de 2013 y a mi memorial de plazo de 20 de Septiembre de 2013.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **11398**, en relación con la claridad del capítulo reivindicatorio de la solicitud en estudio, la Unidad de Invención, y el Nivel inventivo de la presente invención, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones sino que además se establece de manera incontrovertible la patentabilidad de la solicitud en estudio.

3. **UNIDAD DE INVENCION - SOLICITUD DIVISIONAL.**

En primer lugar, el Señor Examinador objeta la unidad de invención de la presente solicitud, señalando que existen al menos 17 conceptos inventivos en la materia reclamada según sean la afinidad de la proteína de unión.

Con respecto a esta objeción, me permito manifestar a ese Despacho que, con el fin de brindar mayor claridad al objeto de la invención, es deseo del solicitante restringir la presente solicitud de manera que esta se refiera solamente a una realización particular de la invención, y presentar una solicitud divisional que cobije otras de las realizaciones reveladas por la solicitud en estudio.

Por lo tanto, debidamente autorizado por el solicitante, y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de

Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución No. 00210 de 15 de Enero de 2001, se ha dividido la presente solicitud de patente en dos **(2)** solicitudes, a saber:

(1) Una solicitud **original** con un **nuevo capítulo reivindicatorio** compuesto por **31** reivindicaciones, el cual encuentra su sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio actualmente presentado a ese Despacho con la presente solicitud número **13-115.304**, y que tienen como base las reivindicaciones 1, 2, 11 a 16, 26, 38 a 41, 45, 47 a 57, 60, 62 a 67 actualmente presentadas, y las revelaciones de la descripción de la solicitud.

(2) Una solicitud fraccionada de la solicitud original **13-115.304** que presenta un nuevo capítulo reivindicatorio constituido por **68** reivindicaciones que encuentran su sustento tanto en la descripción como en el capítulo reivindicatorio originalmente presentados para la solicitud original número **13-115.304**, así como en las reivindicaciones inicialmente presentadas.

En relación con lo anterior me permito señalar que los capítulos reivindicatorios tanto de la presente solicitud como de la nueva solicitud divisional cuentan con pleno sustento en la descripción de la solicitud en estudio, y no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada toda vez que estos reclaman materia que se encuentra cubierta por el alcance del capítulo reivindicatorio originalmente presentado en fase internacional.

Así mismo, me permito resaltar que en virtud de la división realizada, la presente solicitud se dirige únicamente a una realización preferida de la invención. Es así como las proteínas de unión ahora reclamadas por el nuevo capítulo reivindicatorio, corresponden respectivamente a: el anticuerpo monoclonal identificado como 25C8 mAb, caracterizados por sus secuencias particulares de los CDRs que conforman las proteínas de la invención, tal y como se encuentra en la memoria descriptiva en las páginas 13, 16 y Tabla 5, páginas 66 y 67.

En este sentido me permito resaltar que el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio se refiere de manera particular a proteínas de unión que no solo se unen al mismo blanco biológico, sino que además son muy cercanas estructuralmente entre sí, por lo que resulta innegable que dicho capítulo está cubierto por un solo concepto inventivo, a la luz de lo establecido por el Artículo 25 de la Decisión Andina 486 de 2000, superando de esta forma la objeción presentada por el Señor Examinador a este respecto.

4. Acompaño los documentos que detallo a continuación, relacionados con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

**JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.**Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

---

**(1) Solicitud No. 13-115.304: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13".**

(a) Copia de las páginas **151** a **154** que corresponden al nuevo capítulo reivindicatorio, compuesto por **31** reivindicaciones, y que tienen como base las reivindicaciones 1, 2, 11 a 16, 26, 38 a 41, 45, 47 a 57, 60, 62 a 67 actualmente presentadas, y las revelaciones de la descripción de la solicitud número **13-115.304** inicialmente radicada el 8 de Mayo de 2013;

(b) Copia del documento, Martin, et al, "Identifying the CDRs" páginas 432-433 en el capítulo 31 de "*Protein sequence and structure, Analysis of Antibody Variable Domains*", en el manual "Antibody Engineering", Kontermann y Dübel, editores, Springer Verlag, Berlin, 2001, referenciado en el presente memorial; y

(c) Copia de la portada y las páginas 6 a 10 del documento WO02/072636 citado dentro de este memorial.

**(2) Solicitud Divisional: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A INTERLEUCINA-13".**

(a) Recibo número 13-0065234, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;

(b) Recibos número 13-0045950, 13-0045951, 13-0018642, 13-0065215, 13-0065216 y 13-0065217, expedidos por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acreditan el pago de la tasa correspondiente a las reivindicaciones adicionales **11** a **68**;

(c) Resumen, Objeto y Finalidad de la invención y Páginas 1 a 150 del texto de la descripción que corresponden al originalmente presentado en la solicitud número 13-115.304 (formato digital);

(c) Páginas **151** a **165** del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por **68** reivindicaciones que se basan en las reivindicaciones inicialmente presentadas con la solicitud inicial, así como en las enseñanzas de la descripción de la solicitud número **13-115.304**, las cuales se refieren a ciertas realizaciones preferidas de la invención en concordancia con las revelaciones de la descripción y en el capítulo reivindicatorio presentado con la solicitud número **13-115.304** inicialmente radicada (formato digital);

- (e) Listado de secuencias (formato digital);
- (f) Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1 (formato digital);
- (g) Tarjeta de propietario (formato digital);
- (h) Fotocopia del documento que acredita a la suscrita ALICIA LLOREDA y/o a la doctora ANA MARIA CASTRO y/o al doctor GUSTAVO TAMAYO, y/o a al doctor ENRIQUE ÁLVAREZ, en los términos del Párrafo 1º del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **ABBVIE, INC.**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América y domiciliada en North Chicago, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, (formato digital);
- (i) Copia Documento que acredita la cesión entre la sociedad solicitante **ABBOTT LABORATORIES** y la sociedad **ABBVIE, INC**; junto con sus anexos y su Traducción (formato digital).
- (j) Copia de los documentos que acreditan el traspaso que los autores del invento de la referencia, hacen a favor de mis representados de sus derechos sobre el mismo junto con su Traducción Oficial (formato digital);  
y
- (k) Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes.

5. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Ahora bien, con respecto al capítulo reivindicatorio actualmente presentado, el Señor Examinador señala que este no sería claro toda vez que no define de forma inequívoca las proteínas de unión reclamadas, se refiere a un número muy elevado de posibles moléculas superando lo soportado por la descripción de la solicitud, caracteriza las moléculas por resultados a alcanzar e incluye términos imprecisos.

Tomando en consideración estas objeciones, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un **nuevo capítulo reivindicatorio**, que reemplaza al

anterior, el cual hace referencia a realizaciones preferidas de la invención, clarificando así el objeto de la reclamación y haciéndolo aún más distinguible del arte previo.

En conexión con este nuevo capítulo reivindicatorio me permito resaltar que no se constituye de ninguna manera en una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que este enfoca la reclamación en ciertas realizaciones preferidas de la invención en concordancia con las enseñanzas de la descripción, tal como se expone a continuación:

- **Nueva Reivindicación 1.** Esta reivindicación tiene como base la reivindicación 1 actualmente presentada, donde se han definido los CDRs particulares que se derivan del anticuerpo monoclonal murino 25C8 (mAb). Como consecuencia de lo anterior, el nuevo capítulo reivindicatorio se refiere a moléculas completamente definidas y soportadas en la memoria descriptiva de la presente solicitud en la Tabla 5. En las páginas 66 y 67, y en Ejemplo 1.2.C, en las páginas 115 y 116.

Por lo tanto, en virtud del nuevo capítulo reivindicatorio, la reivindicación 1 está dirigida a una proteína de unión de la invención que posee dos características definidas por: (1) la característica funcional de la IL-13 de unión y (2) la característica estructural de poseer seis CDR, es decir, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, caracterizada por las secuencias particulares, tal y como se define en la nueva reivindicación 1. Todas las restantes reivindicaciones dependen de la reivindicación 1, y por lo tanto todas las reclamaciones comparten las mismas características técnicas de la proteína de unión de la reivindicación 1.

- **Nueva Reivindicación 2.** Se basa en la proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de unión comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) y una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL), SEQ ID NOS: 32 y 33 respectivamente, que es identificado en el anticuerpo original 25C8 mAb soportada en la memoria descriptiva en la Tabla 5. En las páginas 66 y 67 de la presente solicitud.

- **Nuevas Reivindicación 3.** Corresponde a una realización de la proteína de unión, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína de unión es capaz de unirse a IL-13 humano de las SEC ID No 1, o la variante de IL-13 en la cual el residuo de arginina de la posición 130 de SEC ID No 1 se reemplaza por un residuo de glutamina. Esta modificación se encuentra soportada en la reivindicación 11 actualmente presentada, en la Tabla 1 de la página 37, y en el Ejemplo 1 de la página 111.

- **Nueva Reivindicaciones 4 a 8.** Tiene como base las reivindicaciones 12 a 16 actualmente presentadas.

- **Nuevas Reivindicaciones 9 y 10.** Tienen como bases las reivindicaciones 40 y 41 actualmente presentadas.
- **Nuevas Reivindicación 11.** Corresponde a la reivindicación 26 actualmente presentada.
- **Nueva Reivindicación 12.** Tiene como base las reivindicaciones 38 y 39 actualmente presentadas.
- **Nueva Reivindicación 13.** Corresponde a la reivindicación 45 actualmente presentada.
- **Nuevas Reivindicaciones 14 a 20.** Corresponden a las reivindicaciones 47 a 53 actualmente presentadas.
- **Nueva Reivindicaciones 21 y 22.** Corresponden a la reivindicación 57 y 54 actualmente presentadas.
- **Nueva Reivindicación 23.** Tienen como base las reivindicaciones 55 y 56 actualmente presentadas.
- **Nueva Reivindicaciones 24, 25 y 26.** Corresponde a la reivindicación 60, 62 y 63 actualmente presentadas respectivamente.
- **Nueva Reivindicación 27.** Corresponde a la unión a IL – 13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 a IL-13 $\alpha$ 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión al receptor basado en ELISA por 70-100% a una concentración de 100nM.
- **Nuevas Reivindicaciones 28 a 31.** Corresponden a las reivindicaciones 64 a 67 actualmente presentadas.

De esta forma, el nuevo capítulo reivindicatorio está constituido por **31 reivindicaciones** que se refieren de manera clara y concisa a las realizaciones preferidas de la presente solicitud.

En conexión con el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio me permito resaltar que este define de manera precisa proteínas de unión preferidas de la invención, definiéndolas por sus CDRs particulares, por lo que el nuevo capítulo

reivindicatorio es completamente claro y conciso al reclamar dichas proteínas de unión de la invención.

De igual forma, el Señor Examinador objeta expresiones imprecisas como "residuo raro" y "un residuo capaz de interactuar con IL-13", las cuales han sido eliminadas del nuevo capítulo reivindicatorio. En consecuencia, en virtud del nuevo capítulo reivindicatorio esta objeción es superada.

De otra parte, me permito señalar que, contrario a lo afirmado por el Señor Examinador, la referencia a la unión de la proteína a IL-13 y la subsecuente modulación de la actividad de esta molécula no es de ninguna manera un resultado a alcanzar sino se constituye en una característica funcional adicional de las proteínas de unión de la invención, que ayuda a definir completamente la materia reclamada.

En este sentido considero pertinente señalar que las reivindicaciones que se refieren a este tipo de características funcionales son reivindicaciones dependientes, lo que implica que están limitadas y circunscritas a las reivindicaciones de las cuales dependen. Por lo tanto, las reivindicaciones que se refieren a este tipo de características no definen el anticuerpo únicamente por su afinidad o función, sino que se refieren a una proteína que tiene una estructura particular, y que adicionalmente interactúa de una forma determinada con una molécula biológica específica.

Así mismo, el Solicitante sostiene respetuosamente que la expresión "donde la proteína de unión es capaz de neutralizar la IL-13", divulga con precisión una característica técnica de la proteína de unión a IL-13 reclamada en la presente solicitud, y se encuentra totalmente soportada en la memoria descriptiva. Es así como, la reivindicación 5 del capítulo reivindicatorio modificado reclama específicamente que la proteína de unión es capaz de neutralizar la función biológica de IL-13. Tal y como se señaló anteriormente, el conjunto de seis CDRs comprendidos en la nueva reivindicación 1 se derivan del anticuerpo 25C8 descrito en la memoria descriptiva, en donde señala específicamente que una proteína de unión a IL-13 es capaz de neutralizar la actividad biológica de IL-13, divulgado en la descripción en la página 50; líneas 5 - 16, página 83; líneas 22 - 29, y página 91; líneas 25 a 35.

Por otra parte, el Ejemplo 1.2.C de la página 115 y la Tabla 7 de la página 115 de la memoria descriptiva muestran claramente como los anticuerpos monoclonales murinos 25C8 y otros mAb, son capaces de neutralizar la función biológica de IL-13, es decir, estos anticuerpos neutralizan la producción de TARC inducida por IL-13 mediante células A-549 con valores de IC50. En consecuencia, la proteína de unión a IL-13 de la nueva reivindicación 5 es totalmente soportada en la memoria descriptiva,

razón por la cual la objeción realizada por el señor Examinador está totalmente superada.

Así mismo, el Señor Examinador objeta expresiones tales como "*un dominio constante de una inmunoglobulina*" y "*agente alquilante*" y considera que la utilización de dichos términos dificulta determinar la extensión del objeto que se desea proteger. Es deseo del Solicitante aclarar que, para la persona medianamente versada en la materia dichas expresiones se entienden completamente, no obstante dichas expresiones han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio.

Adicionalmente, la reivindicación 11 del nuevo capítulo reivindicatorio reclama una forma a cristalina de la proteína de unión a IL-13 de la reivindicación 1. La nueva reivindicación 12 está dirigida a una composición que comprende una proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 11; un ingrediente seleccionado de un grupo preferido de compuestos, y un vehículo polimérico seleccionado de un grupo preferido de vehículos poliméricos. La materia reclamada en estas reivindicaciones se encuentran soportadas en la memoria descriptiva página 21 y 22; página 87; líneas 15 – 23.

Ahora bien, con respecto a la referencia a que la proteína de unión está en forma de proteína cristalizada (reivindicaciones 11 y 12 del nuevo capítulo reivindicatorio), el Señor Examinador asegura que esta no definiría de manera correcta la materia reclamada sugiriendo incluir parámetros fisicoquímicos para su caracterización.

Sobre este particular me permito señalar que para la persona versada en la materia resultaría evidente que la sola referencia a que la proteína de unión es cristalizada es suficiente para una clara comprensión y delimitación de la materia que está siendo reclamada.

De esta forma, el solicitante ha descrito la preparación y la caracterización por cristalografía de rayos X de cristales de un complejo formado entre IL-13 y un fragmento Fab del anticuerpo humanizado 13C5.5, como se muestra en el ejemplo 2.3 de las páginas 137 a 141 de la descripción de la solicitud, lo que permite elucidar el epítipo de unión de IL-13 para el anticuerpo 13C5.5, sin embargo, para la persona versada en la materia es claro que este complejo no es el que se está reclamando dentro de la nueva reivindicación 11, y que la proteína de unión cristalizada no requiere de parámetros de cristalografía de rayos-X para su definición inequívoca.

En este sentido me permito resaltar que la mencionada persona versada en la materia reconocería que para poder medir los parámetros cristalográficos señalados por el Señor Examinador, se requiere obtener cristales de una alta calidad, debido a la

alta precisión de las técnicas analíticas. Sin embargo, en la obtención de proteínas cristalizadas a gran escala, sin bien se tienen propiedades farmacéuticas muy deseables, estos cristales son totalmente inadecuados para estudios cristalográficos de alta precisión como los estudios con rayos-X.

En conexión con lo anterior me permito resaltar que existen un amplio número métodos para la cristalización a gran escala de proteínas, como por ejemplo lo indica el documento WO02/072636, que es citado en la página 87 de la descripción de la solicitud.

De esta forma, del mencionado documento WO02/072636 y de sus conocimientos básicos la persona versada en la materia reconocería que los cristales de las moléculas de anticuerpo que se preparen empleando métodos de cristalización a gran escala para uso farmacéutico, difieren de manera considerable de aquellos empleados en estudios de cristalográficos de rayos-X clásicos. Por ejemplo, la tabla de la página 6 del documento WO02/072636 proporciona un resumen comparativo de las características de cristal requeridas para cristalografía de rayos-X y aquellas para uso farmacéutico como se obtienen en los métodos de cristalización a gran escala.

En efecto, como lo señala la mencionada tabla del documento WO02/072636 mientras que la calidad del cristal es muy importante para una medida precisa en los estudios de cristalografía de rayos-X, este no es el caso de los cristales producidos a gran escala para uso farmacéutico. Así, dichos cristales de anticuerpo obtenidos por los métodos descritos por WO02/072636 son suficientemente puros para estudios farmacéuticos y manufactura, retienen la actividad biológica y son particularmente adecuados para su almacenamiento (como cristales de anticuerpos son menos propensos a interacciones que pueden ocurrir en soluciones), pueden proporcionar preparaciones de administración parenteral que contengan altas concentraciones de la molécula de anticuerpo biológicamente activa, pueden proporcionar preparaciones de dosificación ventajosas (incluyendo altas concentraciones y suspensiones no-acuosas), pueden proporcionar una vida media incrementada *in vivo*, y pueden ser formuladas con (encapsuladas por) portadores poliméricos para la liberación controlada de las moléculas de anticuerpo *in vivo* (ver por ejemplo las páginas 6 a 10 de WO02/072636).

En conexión con lo anterior me permito llamar la atención a los ejemplos del documento WO02/072636 que incluyen una cristalización a gran escala y una formulación de anticuerpos comerciales bien conocidos terapéuticamente efectivos como rituximab (Rituxan ®, anticuerpo monoclonal que se une a CD20), trastuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado que se une a HER-2) e infliximab (Remicade ®, anticuerpo monoclonal quimérico que se une a TNF- $\alpha$  humano). En este sentido es



Consecuentemente, **sería una restricción injusta limitar los polinucleótidos reclamados por la presente solicitud a una única secuencia particular, toda vez que una variación mínima de esta podría codificar la misma proteína de unión de la invención y ofrecer las mismas ventajas técnicas, pero quedaría fuera del alcance de la protección.**

Sumado a lo anterior, me permito resaltar que a partir de los ejemplos específicos revelados dentro de la descripción de la solicitud la persona versada en la materia podría identificar cómo diseñar y obtener por métodos convencionales las moléculas de ácido nucleico que codifiquen a las proteína de unión reclamadas por la invención, las cuales se unen a IL-13.

Por lo tanto, al estar completamente definidas las proteínas de unión de la invención, las moléculas de ácido nucleico reclamadas se encontraran inequívocamente definidas al hacer referencia a que estas codifican dichas proteínas de unión.

De manera similar, los vectores a los cuales se hace referencia dentro del capítulo reivindicatorio están definidos de manera precisa, toda vez que se limitan a aquellas construcciones que incluyen la secuencia de ácido nucleicos que codifican las proteínas de la invención, y por lo tanto no se requiere incluir ninguna característica adicional.

Así mismo, la referencia a las células huésped reclamadas delimita de forma particular que estas deben contener el vector que incluye la secuencia que codifica las proteínas de unión de la invención, lo que implica que no se reclama cualquier célula que sirva para la expresión de proteínas exógenas, sino que se está incluyendo dentro de la invención únicamente aquellas células que sean capaces de expresar las proteínas de unión particulares desarrolladas por el solicitante.

De otra parte, con respecto a la nueva reivindicación 24 me permito señalar que el método allí reclamado es completamente claro, toda vez que se constituye en la forma para obtener una molécula nueva como son las proteínas de unión de la invención, y no se requiere incluir detalles adicionales toda vez que las características distintivas de dicho método residen en que este involucra las proteínas de unión de la invención.

De otra parte, el Señor Examinador señala que la composición farmacéutica que comprende las proteínas de unión de la invención no estaría adecuadamente definida, toda vez que no se detallan los elementos particulares allí contenidos y sus proporciones.

A este respecto muy respetuosamente me permito señalar que dentro del ámbito de las patentes es ampliamente aceptado y conocido que si el objeto principal de la invención es un compuesto, el cual es nuevo e inventivo, las composiciones que comprendan dicho compuesto compartirán estas mismas características, sin necesidad de establecer en particular la sustancias allí comprendidas.

Es así como al estar la invención dirigida a proteínas de unión que son nuevas, la protección de dichas proteínas cobijará cualquier composición que las incluya, independientemente de las características particulares de la formulación como el tipo de excipientes o vehículos empleados.

Por otra parte, el señor Examinador objeta La frase "*un agente terapéutico adicional*", a este respecto me permito aclarar que la nueva reivindicación 31 es dependiente de la nueva reivindicación 30 y está dirigida a una realización preferida de la invención, en la que la composición reclamada en la reivindicación 30 comprende un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial. Una variedad de tales agentes terapéuticos son conocidos y divulgados en la memoria descriptiva de la presente solicitud en la página 108; línea 10 – 33. De esta forma, el Solicitante aclara que tal y como claramente se reclama en la reivindicación 1 la proteína de unión a IL-13, para la persona normalmente versada en la materia es fácilmente distinguible un agente terapéutico diferente al reclamado en la reivindicación 1, empleado en el tratamiento de una enfermedad en la que IL-13 es perjudicial. En consecuencia, la patentabilidad de la composición reclamada en la nueva reivindicación 31, se debe a la presencia de una proteína de unión a IL-13 caracterizada por sus CDRs, nueva e inventiva reclamada en la reivindicación 1, que corresponde a una característica técnica esencial de la composición reclamada que comprende agentes terapéuticos adicionales completamente soportado en la memoria descriptiva, como se explicó anteriormente.

En vista de todo lo discutido anteriormente, me permito señalar que el nuevo capítulo reivindicatorio es totalmente claro y conciso al reclamar una proteína de unión a IL-13 y el proceso preferido de la invención, y por lo tanto se enmarca completamente dentro de lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

6. **NIVEL INVENTIVO.**

Finalmente, el Señor Examinador considera que algunas realizaciones preferidas de la presente solicitud carecerían de altura inventiva con respecto a las enseñanzas de los documentos **US20060140948 (D1)**, y **WO2005062967 (D2)**.

A este respecto el Señor Examinador asegura que para la persona versada en la materia sería evidente combinar las proteínas de unión reveladas en el documento D1, con las secuencias particulares reveladas en D2, y obtener de esta forma las proteínas de unión reclamadas por la solicitud en estudio.

Sobre este particular me permito señalar que los mencionados documentos no sugieren la estructura específica de las proteínas de unión de la invención, tal como son reclamadas dentro del nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta junto con este memorial.

Es así como la presente invención, tal como es reclamada por el capítulo reivindicatorio modificado, se refiere a proteínas de unión a IL-13 que poseen unos CDRs particulares, con secuencias específicas que no son de ninguna manera sugeridas por D1 y D2.

En efecto, D1 describe anticuerpos que se unen a IL-13, pero no sugiere o señala ninguna de las secuencias particulares de los CDRs que conforman las proteínas de la invención.

De manera similar, D2 muestra un gran número de anticuerpos que pueden unirse a IL-13, pero ninguno de estos incluye o sugiere las secuencias particulares de CDRs que poseen los anticuerpos de la presente invención.

Así mismo, al no sugerir ninguno de estos documentos las secuencias particulares de las CDRs de las proteínas de unión de la invención, las enseñanzas del arte previo tampoco brindan herramientas para que la persona versada en la materia previera que proteínas de unión que posean dichas secuencias de CDRs particulares tendrían una alta afinidad a IL-13 y una alta eficacia en un modelo murino de asma inducida por ovoalbúmina, tal como fue comprobado por el solicitante para las proteínas de unión de la invención (ver ejemplos páginas 117 a 150 de la descripción). Por lo tanto, no existe sugerencia o motivación para que la persona normalmente versada en la materia combine las enseñanzas de los documentos D1 y D2 y derive de

manera obvia la proteína de unión a IL-13, máxime cuando no se encuentra divulgadas de manera particular las secuencias que caracterizan las regiones determinantes de la complementariedad.

Dentro de este marco de ideas, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente<sup>2</sup>:

*"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.*

*Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.*

*En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."*

En vista de este señalamiento, y a la luz de lo discutido en el presente memorial, me permito resaltar que al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de los documentos D1 y D2 una proteína de unión que se una a IL-13 y que posea específicamente las secuencias de CDRs que hacen parte de las proteínas de unión que son objeto de la presente invención, y al no tenerse "certeza clara y manifiesta" de que dichas proteínas de unión poseerían una alta afinidad y modulación de la actividad de IL-13, es claro que los documentos D1 y D2 no pueden de ninguna manera afectar el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio.

---

<sup>2</sup> Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

7. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que el nuevo capítulo reivindicatorio presentado junto con este memorial es totalmente claro y conciso al reclamar las proteínas de unión de la invención, haciendo referencia a materia cobijada por el mismo concepto inventivo, cumpliendo así con lo exigido por la Decisión Andina 486 de 2000.

Por otro lado, en virtud de los argumentos discutidos con respecto a los documentos citados, se estableció de manera incontrovertible que las proteínas de unión que son objeto de la solicitud en estudio de ninguna manera resultarían evidentes para la persona versada en la materia a partir de las enseñanzas de estos documentos, demostrando irrefutablemente la patentabilidad de la presente solicitud.

8. Por otro lado, la fecha de presentación de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento es la misma --**08 de Mayo de 2013**--. Adicionalmente, la Clasificación Internacional para esta solicitud fraccionada, acorde con el objeto de las mismas, es la siguiente: **C07K 14/00**.

9. En cuanto a la reivindicación de la prioridad respecto de la solicitud divisional, es la misma invocada en la solicitud original, de la solicitud US 60/843249 de 8 de Septiembre de 2006.

10. Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es la sociedad **ABBVIE, INC.**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América y domiciliada en North Chicago, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, tal como se señaló en mi memorial de Noviembre 14, 2012.

11. Así mismo, reitero a usted que los documentos que acreditan mi calidad de Representante Legal de dicha sociedad para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado junto con mi memorial de 14 de Noviembre de 2012.

12. De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.

**JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.**

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

---

13. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: **[notificacionespatentes@lloedacamacho.com](mailto:notificacionespatentes@lloedacamacho.com)**

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión que posee un dominio de unión a antígeno, siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a IL- 13, y en donde dicho dominio de unión a antígeno posee seis CDRs: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, donde:

CDR-H1 es: S-S-W-I-H (residuos 31-35 de SEC ID NO:32),  
 CDR-H2 es: M-I-H-P-S-D-S-E-T-R-L-N-Q-K-F-K-D (residuos 50-66 de SEC ID NO:32),  
 CDR-H3 es: T-A-T-D-F-D-Y (residuos 99-105 de SEC ID NO:32),  
 CDR-L1 es: K-S-T-K-S-L-L-N-S-D-G-F-T-Y-L-D (residuos 24-39 de SEC ID NO:33),  
 CDR-L2 es: L-V-S-N-R-F-S (residuos 55-61 de SEC ID NO:33), y  
 CDR-L3 es: F-Q-H-N-Y-L-P-L-T (residuos 94-102 de SEC ID NO:33);

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína de unión posee una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) y una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO:32 para VH y SEQ ID NO:33 para VL.

3. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un blanco seleccionado del grupo que consiste de IL-13 humano (SEC ID NO:1) y una variante de IL-13 en la cual un residuo de arginina de la posición 130 de SEC ID NO:1 se reemplaza por un residuo de glutamina.

4. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína de unión es capaz de modular la función biológica de IL-13.

5. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína de unión es capaz de neutralizar la función biológica de IL-13.

6. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación ( $K_{on}$ ) a dicho blanco de al menos  $10^2 M^{-1} s^{-1}$  como se mide por resonancia de plasmón superficial.

7. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación

( $K_{off}$ ) a dicho blanco de al menos  $10^{-3} s^{-1}$  como se mide por resonancia de plasmón superficial.

8. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) a dicho blanco de al menos  $10^{-7}$  M.

9. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable funciona como adyuvante útil para incrementar la absorción, o dispersión de dicha proteína de unión, en donde dicho adyuvante es hialuronidasa.

11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión es un cristal.

12. Una composición para la liberación de una proteína de unión, dicha composición comprende:

(a) una proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 11;

(b) un ingrediente seleccionado del grupo que consiste de: albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metoxipoli(etilenglicol) y polietilenglicol; y

(c) un portador polimérico seleccionado de uno o más de el grupo que comprende: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico) poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil) metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico- alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

13. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión IL-13 de la reivindicación 1.
14. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 13.
15. El vector de la reivindicación 14 en donde dicho vector es pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, o pBJ.
16. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15.
17. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha célula huésped es una célula procariota.
18. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha célula procariota es *Escherichia coli*.
19. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha célula huésped es una célula eucariota.
20. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha célula eucariota es seleccionada del grupo que consiste de: una célula protista, una célula animal, una célula vegetal o una célula fúngica.
21. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicha célula huésped fúngica es una célula de levadura.
22. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicha célula animal es una célula de mamífero, una célula de ave o una célula de insecto.
23. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha célula huésped de mamífero es una célula CHO o es una célula COS.
24. Un método para producir una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula huésped de las reivindicaciones 16 a 23 en medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión.
25. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha proteína de unión es un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

26. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 a IL-13 $\alpha$ 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión al receptor basado en ELISA.

27. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína de unión es un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une a IL-13 humana e inhibe la unión de dicha IL-13 a IL-13 $\alpha$ 2 en un ensayo de unión a receptor basado en superficie celular o en un ensayo de unión al receptor basado en ELISA por 70-100% a una concentración de 100nM.

28. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo es una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub>, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico dual, o un anticuerpo biespecífico.

29. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 28, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humanizado.

30. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 28 y un portador farmacéuticamente aceptable.

31. La composición farmacéutica de la reivindicación 30 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de IL-13 es perjudicial.

R. Kontermann  
S. Dübel  
(Eds.)

# Antibody Engineering



## Antibody Engineering

Interest in recombinant antibody technologies has rapidly increased because of the wide range of possible applications in therapy and diagnosis, especially in cancer treatment. The possibility of generating human antibodies that are not accessible by conventional polyclonal or monoclonal approaches has forced the development of antibody engineering technologies even more.

This manual presents a comprehensive collection of detailed, step-by-step protocols provided by experts in the field. All basic methods needed in antibody engineering – not only methods to generate recombinant antibodies, but also protocols for analysis and their use – and recently developed and emerging technologies are covered. In particular, protocols on the following topics are provided:

- Hybridoma immortalisation
- Generation and screening of antibody gene libraries from human donors, mice and rabbits
- Antibody selection on immunotubes, cells, tissues: proximity and step-back selections
- Creation of human monoclonal antibodies to toxic or highly pathogenic agents without immunisation
- Improvement of antibody binding
- Antibody humanisation
- Genetic fusions for the production of multifunctional antibody derivatives
- Radiolabelled recombinant antibodies
- Bispecific antibodies
- Antibody – enzyme fusions
- Intracellular antibodies
- Determination of affinity and specificity
- Computer analysis of antibody sequence and structure
- Epitope analysis by various phage display systems and peptide spot membranes
- Eukaryotic (plant, baculovirus, yeast, mammalian cells) and prokaryotic production systems for recombinant antibodies
- Purification systems

ISBN 3-540-41354-5



9 783540 413547

<http://www.springer.de>

84

Dr. ROLAND KONTERMANN  
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
Universität Marburg  
Emil-Mannkopff-Str. 2  
35033 Marburg  
Germany

Dr. STEFAN DÜBEL  
Molekulare Genetik  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 230  
69120 Heidelberg  
Germany

ISBN 3-540-41354-5 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data  
Antibody engineering / Roland Kontermann, Stefan Dübel (eds.) p. cm. - (Springer lab manuals)  
Includes bibliographical references and index.  
ISBN 3540413545 (alk. paper)  
1. Recombinant antibodies - Laboratory manuals. I. Kontermann, Roland, 1961-II. Dübel, Stefan. III. Springer  
lab manual.  
QR186.B7 .A56 2001  
616.07'98-dc21

00-067931

This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilm or in any other way, and storage in data banks. Duplication of this publication or parts thereof is permitted only under the provisions of the German Copyright Law of September 9, 1965, in its current version, and permissions for use must always be obtained from Springer-Verlag. Violations are liable for prosecution under the German Copyright Law.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York  
a member of BertelsmannSpringer Science + Business Media GmbH

<http://www.springer.de>

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001  
Printed in Germany

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

Product liability: The publisher cannot guarantee the accuracy of any information about dosage and application thereof contained in this book. In every individual case the user must check such information by consulting the relevant literature.

Production: PRO EDIT GmbH, 69126 Heidelberg, Germany  
Cover design: design & production GmbH, 69121 Heidelberg, Germany  
Typesetting: Mitterweger + Partner, 68723 Plankstadt, Germany  
Printed on acid free paper SPIN 10709876 27/3130/SO 5 4 3 2 1 0

## Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains

ANDREW C.R. MARTIN

### Introduction

The protocols described here provide methods for computational analysis of antibody sequence and structure. With the availability of the World Wide Web, many online analysis tools have been made available and URLs for these are cited throughout the text. The author has provided a Web site at <http://how.to/AnalyseAntibodies/> containing links to all the tools described here.

### Brief review of early work on sequence variability and antibody structure

Porter [1] first proposed the four chain model for antibodies consisting of two light chains and two heavy chains, the latter linked by disulphide bonds. The structure of antibodies has been reviewed in detail by a number of authors [2, 3, 4] while the structural basis of antibody/antigen interactions has also been reviewed extensively [5, 6, 7, 8]. The major points will be briefly covered here.

Edelman and Gall [9] analysed sequences of IgG chains and identified homologous regions which they proposed related to domains of specific function [10]. Wu and Kabat [11] examined the sequences of the region proposed to form the variable domain and identified 'hypervariable' segments within that domain which, they proposed, formed the actual antigen combining site. These were termed 'complementarity determining regions' (CDRs) and it was suggested that the CDRs are supported on a framework formed by the rest of the variable domain.

---

Andrew C.R. Martin, University of Reading, School of Animal and Microbial Sciences, P. O. Box 228, Whiteknights, Reading, RG6 6AJ, UK (phone +44-118-987-5123 x 7022; fax +44-118-931-0180; e-mail [a.c.r.martin@reading.ac.uk](mailto:a.c.r.martin@reading.ac.uk))

IgG is the best studied of the immunoglobulin classes and electron micrographs revealed the 'Y' shape [12]. The structure of antibodies is divided into variable regions able to bind to a virtually infinite range of substrates and constant regions able to perform a given set of common functions for all antibodies within a class (IgG, IgM, etc.).

Light chains consist of  $V_L$  and  $C_L$  domains, while heavy chains consist of  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  and  $C_{H3}$  domains (IgM has an additional  $C_{H4}$  domain). Various fragments are generated by proteolytic digestion or artificially:

|            |                                                                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fv         | $V_H/V_L$ dimer                                                                                         |
| Fab        | a single arm of the 'Y', consisting of a $V_H, C_{H1}/V_L, C_L$ dimer (from Papain cleavage)            |
| $F(ab')_2$ | the two Fab arms of the 'Y' joined by the disulphide(s) between the heavy chains (from Pepsin cleavage) |
| Fc         | The stem consisting of $C_{H2}, C_{H3}/C_{H2}, C_{H3}$ (from Papain cleavage)                           |

The first x-ray crystal structure of a Fab fragment was solved in 1973 [13] and showed that the hypervariable regions corresponded approximately to structural loops. The anti-lysozyme antibody D1.3 was the first antibody crystal structure to be solved complexed with antigen [14] confirming the role of the CDRs in binding antigen.

Variable and constant domains all consist of two twisted antiparallel  $\beta$ -sheets which form a  $\beta$ -sandwich. Constant regions have three and four stranded sheets while variable regions have a further two short strands forming sheets of four and five strands. The two sheets are linked by a conserved disulphide bond and are inclined by approximately  $30^\circ$  to one another [15] varying by up to  $18^\circ$  in variable domains and up to  $10^\circ$  in constant domains [16].

As well as this variability in  $V_L/V_H$  packing angle, the 'elbow angle' describes the flexibility between the  $V_L/V_H$  and  $C_L/C_{H1}$  pseudo-diads. The angle between the arms of the 'Y' is variable as a result of a flexible hinge region (deleted in IgM). The role of flexibility in antigen binding is reviewed by Huber and Bennet [17].

#### Linking sequence and structure

Once a structure has been solved for a protein in a homologous family only one simple ingredient is needed in order to link the sequences of other homologous family members to that structure: a standardized numbering scheme. In this way, one always know that, for example, residue

number 35 is at the start of a  $\beta$ -strand. Insertions in the sequence relative to that standard numbering scheme are given numbers such as 27A, while deletions are accommodated by simply skipping numbers.

Ideally, such schemes are designed in the light of both large amounts of sequence information and multiple structures. Insertion sites (i.e. residue 27A, etc.) are placed only in loop regions (or form  $\beta$ -bulges) and have structural meaning such that topologically equivalent residues in these loops get the same label.

#### The Kabat numbering scheme

The Kabat numbering scheme is the most widely adopted standard for numbering the residues in an antibody in a consistent manner. However the scheme does have problems.

The numbering scheme was developed solely from somewhat limited sequence data. Unfortunately, the position at which insertions are placed in CDR-L1 and CDR-H1 does not match the structural insertion position. Thus topologically equivalent residues in these loops do not get the same number.

The second problem is that the numbering adopts a rigid specification. For example in the potentially very long CDR-H3, insertions are numbered between residue H100 and H101 with letters up to K (i.e. H100, H100A ... H100K, H101). If there are more residues than that, there is no standard way of numbering them. Such situations occur at other positions too. The raw Kabat data files in these cases simply state what the additional insertions are and where they occur, but do not assign numbers to them.

The numbering throughout the chains is shown in Table 1.

#### The Chothia numbering scheme

The Chothia numbering scheme is identical to the Kabat scheme with the exception of CDR-L1 and CDR-H1, where the insertions are placed at the structurally correct positions. This means that topologically equivalent residues in these loops do get the same label.

There are two disadvantages. First, the Kabat scheme is so widely used that some confusion can arise. Second, Chothia et al. erroneously changed their numbering scheme in their 1989 Nature paper [18] such that insertions in CDR-L1 are placed after residue L31 rather than L30. A visual

Table 1. Kabat numbering scheme

**Light chain**

|      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 0    | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20   | 21  | 22  | 23  | 24  | 25  | 26  | 27  |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 27A  | 27B | 27C | 27D | 27E | 27F |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 40   | 41  | 42  | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 |
| 60   | 61  | 62  | 63  | 64  | 65  | 66  | 67  | 68  | 69  | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 |
| 80   | 81  | 82  | 83  | 84  | 85  | 86  | 87  | 88  | 89  | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 |    |    |    |    |
| 95A  | 95B | 95C | 95D | 95E | 95F |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 100  | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 |     |     |     |    |    |    |    |    |    | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 106A |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|      |     |     |     |     |     |     | 107 | 108 | 109 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

**Heavy chain**

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11  | 12  | 13  | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30   | 31  | 32  | 33  | 34 | 35 |    |    |    |    |
| 35A  | 35B  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 40   | 41   | 42   | 43   | 44   | 45   | 46   | 47   | 48   | 49   | 50   | 51  | 52  |     |    |    | 36 | 37 | 38 | 39 |
| 52A  | 52B  | 52C  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 60   | 61   | 62   | 63   | 64   | 65   | 66   | 67   | 68   | 69   | 70   | 71  | 72  | 73  | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 |
| 80   | 81   | 82   |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 82A  | 82B  | 82C  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 100  |      |      | 83   | 84   | 85   | 86   | 87   | 88   | 89   | 90   | 91  | 92  | 93  | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 100A | 100B | 100C | 100D | 100E | 100F | 100G | 100H | 100I | 100J | 100K |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
|      | 101  | 102  | 103  | 104  | 105  | 106  | 107  | 108  | 109  | 110  | 111 | 112 | 113 |    |    |    |    |    |    |

examination of the conformations of CDR-L1 loops shows that L30 is the correct position. In a more recent paper on CDR conformation [19], Chothia's group returns to using residue L30 as the insertion site in CDR-L1.

The structurally correct version of the Chothia numbering (as used before 1989 and since 1997) throughout the chains is shown in Table 2.

**CDR definitions**

Table 3 illustrates the main definitions of the CDRs which are commonly in use:

- The Kabat definition is based on sequence variability and is the most commonly used.
- The Chothia definition is based on the location of the structural loop regions.

Table 2. Chothia numbering scheme

*Light chain*

|      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 0    | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20   | 21  | 22  | 23  | 24  | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 30A  | 30B | 30C | 30D | 30E | 30F |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 40   | 41  | 42  | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 |
| 60   | 61  | 62  | 63  | 64  | 65  | 66  | 67  | 68  | 69  | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 |
| 80   | 81  | 82  | 83  | 84  | 85  | 86  | 87  | 88  | 89  | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 |    |    |    |    |
| 95A  | 95B | 95C | 95D | 95E | 95F |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 100  | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 |     |     |     |    |    |    |    |    |    | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 106A |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|      |     |     |     |     |     |     | 107 | 108 | 109 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

*Heavy chain*

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11  | 12  | 13  | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30   | 31  |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 31A  | 31B  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 40   | 41   | 42   | 43   | 44   | 45   | 46   | 47   | 48   | 49   | 50   | 51  | 52  | 53  | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 |
| 52A  | 52B  | 52C  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 60   | 61   | 62   | 63   | 64   | 65   | 66   | 67   | 68   | 69   | 70   | 71  | 72  | 73  | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 |
| 80   | 81   | 82   |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 82A  | 82B  | 82C  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
|      |      |      | 83   | 84   | 85   | 86   | 87   | 88   | 89   | 90   | 91  | 92  | 93  | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 100  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
| 100A | 100B | 100C | 100D | 100E | 100F | 100G | 100H | 100I | 100J | 100K |     |     |     |    |    |    |    |    |    |
|      | 101  | 102  | 103  | 104  | 105  | 106  | 107  | 108  | 109  | 110  | 111 | 112 | 113 |    |    |    |    |    |    |

- The AbM definition is a compromise between Kabat and Chothia definitions based on that used by Martin et al. [20] used by Oxford Molecular's AbM antibody modelling software.
- The contact definition has been recently introduced by MacCallum et al. [21] and is based on an analysis of which residues are involved in antigen binding in the available antibody:antigen complex crystal structures. This definition is likely to be the most useful for people wishing to perform mutagenesis to modify the affinity of an antibody since these are residues which are most likely to take part in interactions with antigen.

Note that the end of the Chothia CDR-H1 loop, when numbered using the Kabat numbering convention, varies between H32 and H34 depending on the length of the loop as illustrated in Figure 1.

Table 3. Different definitions of the CDRs

| Loop                   | Kabat      | AbM        | Chothia        | Contact    |
|------------------------|------------|------------|----------------|------------|
| L1                     | L24 - L34  | L24 - L34  | L24 - L34      | L30 - L36  |
| L2                     | L50 - L56  | L50 - L56  | L50 - L56      | L46 - L55  |
| L3                     | L89 - L97  | L89 - L97  | L89 - L97      | L89 - L97  |
| H1 (Kabat numbering)   | H31 - H35B | H26 - H35B | H26 - H32...34 | H30 - H35B |
| H1 (Chothia numbering) | H31 - H35  | H26 - H35  | H26 - H32      | H30 - H35  |
| H2                     | H50 - H65  | H50 - H58  | H52 - H56      | H47 - H58  |
| H3                     | H95 - H102 | H95 - H102 | H95 - H102     | H93 - H101 |

[Note that a recent paper from Chothia's group has used the AbM definition for CDR-H2]

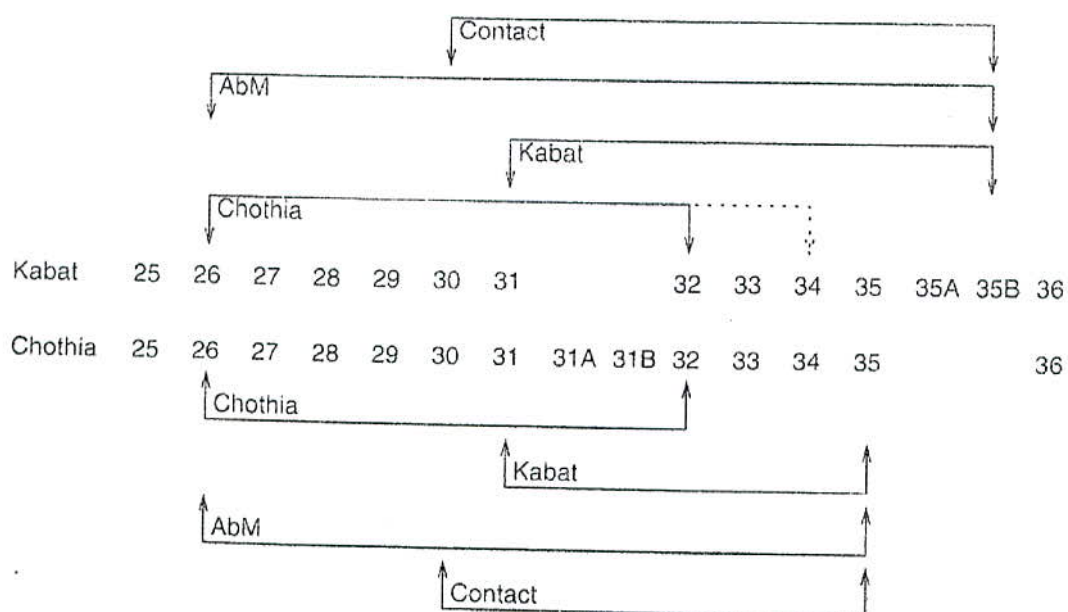


Fig. 1. Boundaries of different definitions of CDR-H1 using the Kabat and Chothia numbering schemes.

### Procedure

The following subprotocols describe a number of aspects of sequence/structure analysis.

#### Accessing Kabat sequence data

Kabat data may be accessed in a number of ways described below:

##### Download the raw data

The raw Kabat sequence data may be downloaded for local analysis from either:

- <ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat/>
- <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>

The most up-to-date raw data is in the fixlen subdirectory (or in FASTA format in the fasta\_format subdirectory). This site also provides analysed data in PostScript format, but this is not kept up to date so regularly.

##### E-Mail query access

The Kabat data may be queried at Kabat and Wu's site by EMail using the SeqhuntII server [22] at [seqhunt2@immuno.bme.nwu.edu](mailto:seqhunt2@immuno.bme.nwu.edu). Sending mail to this address containing only the word 'help' in the message will return a help file. This document should be obtained for full details of using the SeqhuntII server. In brief, the server allows all sequence classes and annotations to be searched and returned and allows a novel antibody sequence to be compared against the database. Conditions for the search may be combined using and/or/not and nucleotide and amino acid patterns may be specified allowing mismatches.

As well as returning the sequences themselves, the server can be used to calculate the variability of the group of sequences hit by your sequence and residue distribution plots may be calculated.

A query has two parts separated by the word 'Begin'. In the first part, one specifies overall parameters for the search such as the format of the output, number of hits to return, etc. In the second part, one can specify restrictions on the search and patterns to match. Numerous examples are given in the help document. After the restriction comes a pattern which is either a nucleotide or amino acid sequence (fragment) to be matched while allowing a specified number of mismatches.

The Kabat database web site set up by Johnson and Wu (<http://immuno.bme.nwu.edu>) provides a number of facilities for antibody sequence analysis and for searching the Kabat data. Access via web site

The standard Kabat numbering for a new sequence may be obtained at <http://imuno.bme.nwu.edu/align.html> by automated alignment with consensus sequences. Currently only nucleotide sequences of Ig  $\kappa$  or  $\lambda$  chains is supported, though the Web page promises that other types of sequence will be supported in future.

Variability within a sequence type (e.g.  $\kappa$  chains, T-cell receptor, etc) can be calculated at <http://imuno.bme.nwu.edu/variability.html>. You may restrict the sequences within a group by specifying patterns to match.

The Seqhunt service (<http://imuno.bme.nwu.edu/seqhunt.html>) allows you to search through a set of fields for a value which you enter. Alternatively, you may search all fields. This is a straight text search of a sequence pattern match. Available fields are: Identification Number, Sequence Type, Sequence Name, Species, Authors, Journals, Antigen and Notes.

KabatMan [23] is a specialised database for the analysis of Kabat antibody sequence data. It may be queried using a language similar to SQL ('structured query language' – a standard for querying relational databases) or via a point and click interface at <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>. KabatMan

While the software provided by Johnson, Wu and Kabat at <http://imuno.bme.nwu.edu> is largely aimed at finding all the information about a single antibody, KabatMan is more suited to global analysis of the antibody data. It also provides a more direct link with structural information by allowing searches to specify individual amino acids or the contents of one of the six CDRs. For example, one could find all the antibodies which bind to DNA, but do not contain arginine in CDR-H3 using the query:

```
SELECT    name
WHERE     antigen INC 'dna'
          h3 <> ' ' AND
          h3 INC 'R' NOT AND
```

The 'SELECT' statement specifies which results are to be returned (in this case the name of the antibody). The 'WHERE' statement first specifies that the antigen should be DNA, then specifies that the sequence of CDR-H3 should not be blank (i.e. unknown) and finally specifies that CDR-H3 should not include the letter 'R' (i.e. arginine). More examples are given in the paper which describes KabatMan and in the on-line help.

When using KabatMan to find details of a specific antibody, it is important not to overspecify the antibody. For example if you want to find details of the mouse anti-lysozyme antibody HYHEL-5, then the name, HYHEL-5 uniquely identifies the antibody - there is no point in specifying the antigen, class or animal source.

**SUBIM** Deret et al. [24] have written a program, SUBIM, for the analysis of Kabat sequence data. Many of the data access functions of this program are also available in KabatMan (described above). The program may be downloaded from <ftp://ftp.lmcp.jussieu.fr/pub/subim/> and must be compiled and installed locally. It has no form of graphical user interface.

#### Accessing IMGT sequence data

Because so many immune-related sequences are being deposited with the major sequence databanks (EMBL, Genbank and DDBJ), they are starting to skew the data these contain and EMBL have begun to separate the immune sequences into a separate databank known as IMGT [25]. The data in IMGT are updated rather more frequently than the Kabat data (which is hand-verified by Johnson and Wu).

The chief advantage of IMGT is the volume of data it contains and the rate at which this is updated. There are however, a number of disadvantages compared with the Kabat data. First, they have introduced a new numbering scheme such that insertion codes (like 27A) are not needed for any normal antibodies (see <http://imgt.cnusc.fr:8104/textes/IMGTindex/numbering.html>). This, of course, is incompatible with the numbering schemes used by Kabat or Chothia. Second, the raw data (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt/ligm/>) which is stored in a format similar to the SwissProt databank, contains only DNA sequence (no protein translation), does not contain a mapping to the numbering scheme and does not specify the antigen in a standardised easily parsable form (description records may contain specificity subrecords, though on other occasions the information may just be in free text, or may be missing).

IMGT provides a number of services via the web:

- <http://www.ebi.ac.uk/imgt/> EBI site which provides access to the main site and to a Sequence Retrieval Service (SRS) interface
- <http://imgt.cnusc.fr:8104> Main IMGT server

- <http://imgt.cnusc.fr:8104/dnaplot> A facility for aligning a DNA sequence against the sequence library and finding the most similar sequences
- <http://imgt.cnusc.fr:8104/informatics> A Java programming interface for accessing IMGT from computer programs written in Java

The main IMGT server (<http://imgt.cnusc.fr:8104>) provides a hierarchical interface to the data allowing one to home in on a particular sequence. This is not suited to global analysis of the data. In future, IMGT data will be integrated into KabatMan.

#### Family assignment

The sequence family can be assigned through Johnson and Wu's page at <http://immuno.bme.nwu.edu/famgroup.html>. The nucleotide sequence for the variable region must be entered and is compared with the variable region of reference sequences for each family. No attempt is made to find out where the variable region begins if it is a fragment, although Johnson, Kabat and Wu's SeqhuntII programs (<http://immuno.bme.nwu.edu/seqhunt.html>) may be used to do this. It is then necessary to add leading spaces to the sequence to align the fragment correctly. Sequences must be at least 225 bases in length. Ideally one should have the entire sequence of the variable region.

#### Assigning subgroups

Deret's SUBIM program [24] which may be downloaded from <ftp://ftp.lmcp.jussieu.fr/pub/subim/> allows the assignment of the variability subgroup of novel human sequences by comparison of the N-terminal 15 residues with consensus sequences determined by Kabat et al. [26].

Sophie Deret has kindly made this part of the SUBIM program available to the author who has made this accessible via a Web page (<http://www.bioinf.org.uk/abs/hsubgroup.html>). In addition, the functionality has been incorporated into KabatMan to allow human subgroup assignment for sequences in the Kabat data.

Kabat and Wu's page (<http://immuno.bme.nwu.edu/subgroup.html>) also supports sub-group assignment in a more extensive manner allowing input of both amino acids and nucleotides and mouse/human heavy/ $\kappa/\lambda$ . Note that unlike the Deret method, it is necessary to know whether the input sequence is heavy/ $\kappa/\lambda$ .

### Identifying the CDRs

This protocol describes how to identify the CDRs (Kabat definition) by examining the sequence. Of course there are always (minor) exceptions to these rules, so the word 'always' should be interpreted with care! For example, CDR-L2 is always 7 residues, but antibody NEW (Protein Databank code: 7FAB, <http://www.rcsb.org>) has a deletion in this region. This also means that the position of the start of CDR-L3 is no longer 33 residues after the end of CDR-L2.

#### CDR-L1

- Start Approx residue 24
- Residue before is always C
- Residue after is always W. Typically WYQ, but also, WLQ, WFQ, WYL
- Length 10 to 17 residues

#### CDR-L2

- Start Always 16 residues after the end of CDR-L1
- Residues before generally IY, but also, VY, IK, IF
- Length always 7 residues

#### CDR-L3

- Start Always 33 residues after end of CDR-L2
- Residue before is always C
- Residues after always FGXG
- Length 7 to 11 residues

#### CDR-H1

- Start Approximately residue 31 (always 9 after a C) (Chothia/AbM definition starts 5 residues earlier)
- Residues before always CXXXXXXXX
- Residues after always W. Typically WV, but also WI, WA
- Length 5 to 7 residues (Kabat definition); 7 to 9 residues (Chothia definition); 10 to 12 residues (AbM definition)

**CDR-H2**

- Start Always 15 residues after the end of Kabat/AbM definition of CDR-H1
- Residues before typically LEWIG, but a number of variations
- Residues after K[RL]IVFT[AT]SIA (where residues in square brackets are alternatives at that position)
- Length Kabat definition 16 to 19 residues (AbM definition and most recent Chothia definition ends 7 residues earlier; earlier Chothia definition starts 2 residues later and ends 9 earlier)

**CDR-H3**

- Start Always 33 residues after end of CDR-H2 (always 3 after a C)
- Residues before always CXX (typically CAR)
- Residues after always WGXX
- Length 4 to 24 residues

**Screening new antibody sequences**

Given a new antibody sequence, one is likely to wish to assign families and subgroups using the tools described above. An additional facility is available at <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html> to identify unusual features in the sequence.

It is simply necessary to enter the amino acid sequence of your Fv fragment (one or both chains). Optionally you may include the whole Fab fragment, but only the Fv portion will be tested.

The tool aligns the provided sequence with a standard sequence in order to assign standard Kabat numbering and then uses the KabatMan database to identify unusual amino acids (i.e. those occurring in less than 1% of the data in the database). This allows the identification of potential cloning artifacts and sequencing errors. If unusual features are verified as being correct, then these residues are likely to be critical to the specificity of the antibody. The method is described in detail at <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqmethod.html>.

The results need to be examined carefully. A typical sequence has 1-2 'unusual' residues. Very unusual sequence features and loops longer than anything observed in the current Kabat database may cause the alignment

stage to fail causing errors in the Kabat numbering. Errors can also occur at the C-terminus of the chains. These problems can lead to residues being flagged as 'unusual' when they are not.

Thus, if more than 2 or 3 unusual residues are seen (especially outside the CDRs and if insertions/deletions are observed), the first step is to ensure that the alignment and assignment of Kabat numbering is correct (check the features described in the section "Identifying the CDRs"). If all is judged correct with the alignment, the clone should be checked. If it is confirmed that no cloning errors have occurred, then it is likely that these are key features of the antibody.

#### Assigning canonicals

The analysis by Chothia and co-workers introduced the concept of canonical conformations for the CDRs. It was proposed that these conformations were influenced by just a small number of residues either in the CDRs or in the framework regions which pack with them. This allows a direct prediction of three-dimensional conformation from sequence.

Chothia and co-workers have published around 10 papers describing this analysis, but unfortunately do not provide a summary of the required amino acids to assign canonical classes. Table 4 attempts to summarise the data from their publications together with results from Martin and Thornton [27]. Chothia numbering of the sequences is used throughout.

#### Modelling antibodies

There are various approaches to modelling antibodies, but it is widely accepted that methods based on Chothia's analysis of CDR canonical conformations provide the best results where they can be applied.

Any modelling procedure involves the following steps:

##### Build the framework

Antibody crystal structures from the Protein Databank (PDB, <http://www.rcsb.org>) are searched to identify the most similar light and heavy chains. These are identified separately. If the best match for the light chain is La (paired with Ha) and the best match for the heavy chain is Hb (paired with Lb) then the structure of La is least squared fitted to Lb and chains La and Hb are retained, deleting Ha and Lb. In this way, the  $V_L/V_H$  packing angle is inherited from Lb/Hb. To inherit the packing angle from La/Ha, then the fitting is performed on the heavy chains. The choice is relatively

Table 4. Key residues which define the Chothia canonical classes. For CDR-H1, Chothia et al. suggest that residue H27 is also a key residue, but Martin & Thornton did not find this residue influences the conformation. Similarly, for CDR-H2, Chothia et al. identify residue H52A as a key residue in determining the conformation of Class 2 and 3, but Martin & Thornton found that this residue does not influence the conformation.

|        |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
|--------|---------|------|------|-----|----|----|----|-----|----|
| CDR-L1 |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Class  | 1       | 2    | 3    | 4   | 5  | 6  | 5λ | 6λ  | 7λ |
| Length | 10      | 11   | 17   | 16  | 15 | 12 | 13 | 14  | 14 |
| L2     | I       | I    | I    | VIL | I  | N  |    |     |    |
| L25    | A       | A    | S    | S   | A  | A  | G  | G   | S  |
| L29    | VIL     | VIL  | VIL  | L   | V  | V  |    |     |    |
| L30    | -       |      |      |     |    |    | I  | I   | V  |
| L30D   |         |      |      | G   |    |    |    |     |    |
| L33    | ML      | VIL  | L    | L   | L  | L  | V  | V   | A  |
| L71    | YF      | YF   | YF   | F   | F  | Y  | A  | A   | A  |
| CDR-L2 |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Class  | 1       |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Length | 7       |      |      |     |    |    |    |     |    |
| L34    | N       |      |      |     |    |    |    |     |    |
| CDR-L3 |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Class  | 1       | 2    | 3    | 4   | 5  | 4λ | 5λ |     |    |
| Length | 9       | 9    | 8    | 7   | 10 | 9  | 11 |     |    |
| L90    | QNH     | Q    | Q    | Q   | Q  |    |    |     |    |
| L94    |         | P    |      |     |    |    |    |     |    |
| L95    | P       | L    | P    |     |    |    |    | DNG |    |
| L97    | T       | T    |      | -   | T  | IV | VG |     |    |
| CDR-H1 |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Class  | 1       | 2    | 3    |     |    |    |    |     |    |
| Length | 10      | 11   | 12   |     |    |    |    |     |    |
| H24    | TAVGS   | VF   | VFG  |     |    |    |    |     |    |
| H26    | G       | G    | G    |     |    |    |    |     |    |
| H29    | IFLVS   | IL   | VIL  |     |    |    |    |     |    |
| H34    | IVMWTL  | WC   | WV   |     |    |    |    |     |    |
| H94    | RKGSHTA | HR   | HR   |     |    |    |    |     |    |
| CDR-H2 |         |      |      |     |    |    |    |     |    |
| Class  | 1       | 2    | 3    | 4   |    |    |    |     |    |
| Length | 9       | 10   | 10   | 12  |    |    |    |     |    |
| H54    |         |      | SGND | KS  |    |    |    |     |    |
| H55    | GD      | GS   | GS   | Y   |    |    |    |     |    |
| H71    | RHVI    | VALT | R    | R   |    |    |    |     |    |

arbitrary and it may be worth constructing two models. Structural fitting is best performed using a program such as ProFit (<http://www.bioinf.org.uk/software/>).

The sidechains of the framework are then replaced using automated processes available in molecular graphics programs, or software such as CONGEN [28]. Sidechains are generally built using the 'Maximum Overlap Protocol' where the atom positions are inherited from the parent wherever possible and where not possible, conformations are taken from a rotamer library.

**Build the CDRs** The methods described above are used to identify canonical classes. This is generally possible for 4 or 5 of the 6 CDRs. CDR-H3 is too variable to be classified at present (it may become possible once sufficient structures are available and a number of authors have begun to suggest limited sets of rules). Antibody crystal structures from the PDB are then searched to find CDRs of the correct canonical classes with maximum sequence identity to the sequence to be modelled. These loops are then attached to the framework either manually using molecular graphics, or by using a least squares fitting program, such as ProFit, to fit the 3 residues on either side of the loop itself (i.e. within the framework region).

CDRs which cannot be built using canonicals may be built by conformational search using CONGEN, by searching the PDB for loops of the same length and with similar distance between the attachment points to the framework, or by combined methods such as CAMAL [20]. Such loops can never be built with a very high degree of confidence in their accuracy.

Sidechains of the CDRs are then built as described above.

**Refinement and assessment** Finally the model may be refined by energy minimisation using a package such as GROMOS, AMBER, CHARMM or DISCOVER and structural quality should be assessed using a program such as ProCheck (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>) or WhatCheck (<http://swift.embl-heidelberg.de/whatcheck>). Both programs may be accessed via an online server at <http://biotech.embl-heidelberg.de:8400>.

**Automated methods** The above description details the stages which are necessary in a manual modelling protocol. As an alternative, a number of automated procedures are available. Two of these are general automatic modelling programs and may be used to generate models in a quick and simple manner. However, they do not take advantage of the special properties of antibodies. The third and fourth are programs specially designed for the automated modelling of antibodies.

- MODELLER is a general purpose automated protein modelling program (<http://guitar.rockefeller.edu/modeller/modeller.html>). As such, it is able to produce reasonably reliable models of structures given just a sequence or a sequence aligned to one or more templates from the Protein Databank. However, since it is not designed specifically for antibody modelling, it does not make use of Chothia's canonical analysis and will not model the CDRs as accurately. The software must be downloaded and run locally on a Unix type computer system.
- SwissModel is another general purpose automated protein modelling program which is accessible over the Web and does not need to be installed and run locally (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>). The quality of models is generally not as high as those created by MODELLER and the same caveats about not being antibody-specific apply.
- AbM is a commercial program available from Oxford Molecular (<http://www.oxmol.co.uk>) being antibody specific, it automates the manual procedure described above taking account of canonical structures and using the CAMAL modelling method described by Martin et al. [20] for modelling those loops which cannot be built using canonicals.
- WAM is a method based on AbM available on line (<http://antibody-bath.ac.uk/>). The first model is free, but further runs incur a charge.

#### Analysis tools applied to humanisation

Sequence/structure analysis programs such as KabatMan can be applied to problems such as humanisation as well as being used for general analysis. Recent work by Saldanha, Martin and Leger [29] used KabatMan to identify a residue which restored the binding of a humanized antibody.

In brief, the humanisation protocol was as follows. Mouse CDRs were grafted onto human frameworks with highest sequence identity. Residues in the framework were then considered for back-mutation to restore full binding. First, key residues (identified by Chothia's canonical analysis) were identified in the framework and back-mutated to those seen in the original mouse antibody. KabatMan was then used to identify residues in the human framework which are particularly unusual in mouse frameworks, even though they may be remote from the combining site. Nine such positions were identified and these were examined on a computer

model. Seven of these were conservative and one was a surface residue. However, position 9 in the light chain was unique to the human kappa IV subclass and only seen in one of 1848 mouse kappa sequences. Back-mutation of this residue to that seen in the mouse sequence completely restored binding.

### References

- [1] Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73:119-127, 1959.
- [2] Alzari, P. M., Lascombe, M.-B., and Poljak, R. J. Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 6:555-580, 1988.
- [3] Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994.
- [4] Searle, S. J., Pedersen, J. T., Henry, A. H., Webster, D. M., and Rees, A. R. Antibody structure and function. In: "Antibody Engineering", (Borreback, C. A. K., ed.). Oxford University Press, 1994:3-51.
- [5] Padlan, E. A. The structural basis for the specificity of antibody-antigen reactions and structural mechanisms for the diversification of antigen-binding specificities. *Quant. Rev. Biophys.* 10:35-65, 1977.
- [6] Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. V., and Poljak, R. J. The structural basis of antigen-antibody recognition. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* pages 139-159, 1987.
- [7] Davies, D. R., Padlan, E. A., and Sheriff, S. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.
- [8] Wilson, I. A. and Stanfield, R. L. Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:113-118, 1993.
- [9] Edelman, G. M. and Gall, W. E. The antibody problem. *Annu. Rev. Biochem.* 38:415-466, 1969.
- [10] Edelman, G. M. The covalent structure of a human  $\gamma$ -immunoglobulin: XI. functional implications. *Biochemistry* 9:3197-3205, 1970.
- [11] Wu, T. T. and Kabat, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* 132:211-250, 1970.
- [12] Valentine, R. C. and Green, N. M. Electron microscopy of an antibody-hapten complex. *J. Mol. Biol.* 27:615-617, 1967.
- [13] Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., and Saul, F. The three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3305-3310, 1973.
- [14] Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. V., and Poljak, R. J. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 6 Å resolution. *Nature (London)* 313:156-158, 1985.
- [15] Chothia, C. and Janin, J. Relative orientation of close-packed  $\beta$ -pleated sheets in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4146-4150, 1981.
- [16] Lesk, A. M. and Chothia, C. Evolution of proteins formed by  $\beta$ -sheets: II. The core of the immunoglobulin domains. *J. Mol. Biol.* 160:325-342, 1982.

- [17] Huber, R. and Bennett, W. S. Antibody-antigen flexibility. *Nature (London)* 326:334-335, 1987.
- [18] Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M., and Poljak, R. J. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature (London)* 342:877-883, 1989.
- [19] Al-Lazikani, B., Lesk, A. M., and Chothia, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273:927-948, 1997.
- [20] Martin, A. C. R., Cheetham, J. C., and Rees, A. R. Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272, 1989.
- [21] MacCallum, R. M., Martin, A. C. R., and Thornton, J. M. Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* 262:732-745, 1996.
- [22] Johnson, G., Wu, T.-T., and Kabat, E. A. SEQHUNT. A program to screen aligned nucleotide and amino acid sequences. *Methods Mol. Biol.* 51:1-15, 1995.
- [23] Martin, A. C. R. Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 25:130-133, 1996.
- [24] Deret, S., Maissiat, C., Aucouturier, P., and Chomilier, J. SUBIM: A program for analysing the Kabat database and determining the variability subgroup of a new immunoglobulin sequence. *Comput. Appl. Biosci.* 11:435-439, 1995.
- [25] Giudicelli, V., Chaume, D., Bodmer, J., Muller, W., Busin, C., Marsh, S., Bontrop, R., Marc, L., Malik, A., and LeFranc, M.-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nuc. Ac. Res.* 25:206-211, 1997.
- [26] Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. "Sequences of Proteins of Immunological Interest". U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes for Health, Bethesda, MD, Fifth edition, 1991.
- [27] Martin, A. C. R. and Thornton, J. M. Structural families in homologous proteins: Automatic classification, modelling and application to antibodies. *J. Mol. Biol.* 263:800-815, 1996.
- [28] Bruccoleri, R. E. and Karplus, M. Prediction of the folding of short polypeptide segments by uniform conformational sampling. *Biopolymers* 26:137-168, 1987.
- [29] Saldanha, J. W., Martin, A. C. R. and Léger, O. B. P. A single backmutation in the human  $\kappa$ IV framework of a previously unsuccessfully humanized antibody restores the binding activity and increases the secretion in cos cells. *Molecular Immunology* 36:709-719, 1999.

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/072636 A2

(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C07K 16/00,  
A61K 39/395, G01N 33/53, A61K 47/06, 47/36, 47/38,  
47/42, A61P 35/00, G01N 33/569

(US). GOVARDHAN, Chandrika, P. [US/US]; 9 Scot-  
land Road, Lexington, MA 02420 (US). YANG, Mark,  
X. [US/US]; 59 Bridge Street, Newton, MA 02458 (US).  
MARGOLIN, Alexey, L. [US/US]; 193 Upland Avenue,  
Newton, MA 02161 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/49628

(22) International Filing Date:  
26 December 2001 (26.12.2001)

(74) Agents: PIERRI, Margaret, A. et al.; c/o Fish & Neave,  
1251 Avenue of the Americas, New York, NY 10020 (US).

(25) Filing Language: English

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

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/258,704 28 December 2000 (28.12.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): ALTUS  
BIOLOGICS INC. [US/US]; 625 Putnam Avenue, Cam-  
bridge, MA 02139-4807 (US).

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): SHENOY, Bhami  
[US/US]; 16 Westgate Drive, T-6, Woburn, MA 01801

[Continued on next page]

(54) Title: CRYSTALS OF WHOLE ANTIBODIES AND FRAGMENTS THEREOF AND METHODS FOR MAKING AND USING THEM

Rltuximab Crystals



(57) Abstract: Methods are also provided for preparing stabilized formulations of whole antibody crystals or antibody fragment crystals using pharmaceutical ingredients or excipients and optionally encapsulating the crystals or crystal formulations in a polymeric carrier to produce compositions and using such protein crystals for biomedical applications, including delivery of therapeutic proteins and vaccines.

WO 02/072636 A2

WO 02/072636 A2



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

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

**Published:**

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

The following table provides a general comparison between crystallization for X-ray crystallographic structural studies and large-scale crystallization according to this invention:

|    |                                        |                                      |                                |
|----|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 5  | PARAMETER                              | X-RAY<br>CRYSTALLOGRAPHIC<br>STUDIES | LARGE-SCALE<br>CRYSTALLIZATION |
|    | Crystal size<br>(longest<br>dimension) | > 500 $\mu$ m                        | 0.1 - 100 $\mu$ m              |
|    | Crystal quality                        | Very important                       | Less important                 |
| 10 | Growth rate                            | Not important                        | Important                      |
|    | Yield                                  | Not important                        | Very important                 |
|    | Precipitate                            | Usually present                      | Rarely present                 |

Crystallization of whole antibodies, or  
15 fragments thereof, on a large scale, a process allowing an alternative route of delivery for therapeutic antibodies, has never before been explored.

Antibodies, and fragments thereof, are increasingly employed in the pharmaceutical, diagnostic  
20 and research industries. There is a great need for alternative stabilization procedures, which are fast, inexpensive and Moreover, stabilization procedures are needed that do not involve the excessive use of excipients, which can interfere with the functions of  
25 whole antibodies.

The present invention seeks to overcome barriers to the widespread use of antibodies for therapeutic and other biomedical purposes by providing methods for crystallizing whole antibodies, and  
30 fragments thereof, on a large scale.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the above-described obstacles by employing the most stable form of an active, whole antibody or fragment thereof, the crystalline form. In one embodiment of this invention, crystals of a whole antibody, or fragment thereof are used as is or in formulations or compositions, for various biomedical applications. According to alternate embodiments of this invention, crystals of a whole antibody, or fragment thereof, or formulations or compositions comprising them, may be: (1) stabilized by adding ingredients or excipients to the crystals, or (2) encapsulated within a polymeric carrier to produce a composition that contains each crystal for delivery to a subject and subsequent release of active, whole antibodies. Any whole antibody or fragment thereof may be crystallized and/or stabilized in this manner, according to the methods of this invention.

Various aspects of this invention are particularly advantageous.

First, crystallinity of stored materials is very important, since large scale crystallization can be introduced as a purification step and/or concentration step in clinical manufacturing processes, such as those for manufacturing therapeutics and vaccines. Moreover, large scale crystallization can replace some of the purification steps in the manufacturing process. For example, whole antibody crystallization can streamline the production of antibody formulations and compositions, making the procedure more efficient and affordable.

Second, macromolecular interactions which occur in solution are prevented or severely reduced in the crystalline state, due to considerable reduction of all reaction rates. Thus, the crystalline state is uniquely suited to the storage of mixtures of whole antibodies, or fragments thereof.

Third, solid crystalline preparations may be easily reconstituted to generate ready to use parenteral preparations having very high antibody concentrations. Typically, for subcutaneous administration, injection volumes of 1.5 ml or less are well tolerated. Thus, for proteins that are dosed at 1 mg/kg on a weekly basis, a protein concentration of at least 50 mg/ml is required and 100-200 mg/ml is preferred. Such concentrations are difficult to achieve in liquid preparations, due to problems of aggregation and viscosity of the liquid samples. In contrast, they can be achieved in the crystalline preparations, or formulations or compositions thereof, according to this invention.

Fourth, whole antibody crystals, or crystals of antibody fragments, also constitute a particularly advantageous form for pharmaceutical dosage preparation. The crystals may be used as a basis for slow release *in vivo*. As those of skill in the art will appreciate, particle size is important for the dissolution of crystals and release of activity. Those skilled in the art will also appreciate the rate of antibody release to be more predictable if the crystals have substantially uniform particle size and do not contain amorphous precipitate. Thus, whole antibody crystals, or crystals of antibody fragments, may be advantageously used on implantable devices, such as those described in PCT patent application WO 96/40049.

Implant reservoirs are generally on the order of 25-250  
μl. With this volume restriction, a preparation of  
high concentration (greater than 10%) and a minimum  
amount of suspension vehicle is preferred. Whole  
5 antibody crystals, or crystals of antibody fragments,  
according to this invention may also be easily  
formulated in non-aqueous suspensions in such high  
concentrations.

Fifth, the use of whole antibody crystals, or  
10 crystals of antibody fragments, and formulations and  
compositions comprising them, for slow release of the  
antibody after delivery to the intended site,  
advantageously permits the effective biological half-  
life of the whole antibody or antibody fragment in vivo  
15 to be increased.

Sixth, another advantage of whole antibody  
crystals, or crystals of antibody fragments, is that  
certain variables can be manipulated to modulate the  
release of macromolecules over time. For example,  
20 crystal size, shape, formulation with excipients that  
effect dissolution, and encapsulation into a polymer  
matrix can all be manipulated to produce delivery  
vehicles for the antibodies.

The process of crystallization of whole  
25 antibodies serves not only as a powerful protein  
purification or stabilization tool but also affords the  
most concentrated protein form possible. Such effects  
have significant potential for delivery to the intended  
delivery site of a high dose of whole antibodies, or  
30 fragments thereof. Furthermore, by employing crystals  
or crystal formulations or compositions of whole  
antibodies or antibody fragments, for delivery to  
subjects, it is possible to carry out the controlled  
release of the whole antibodies or fragments thereof at

10

a rate that is consistent with the needs of the particular subject or disease process. As the rate of crystal dissolution depends on crystal morphology, crystal size and the presence of excipients, and the  
5 particular encapsulation technique or polymer preparation employed, crystalline whole antibodies or fragments thereof may also be used as a carrier-free slow release dosage form.

Whole antibodies or fragments thereof which  
10 are not stable when held in solution at ambient or elevated temperatures can nevertheless be successfully stored in dry crystalline form for long periods of time at such temperatures when they are crystallized according to the methods of this invention.

15                    BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the morphology of Rituximab (Rituxan™) crystals prepared as described in Example 6. Rituximab crystals formed in needle clusters.

Figure 2 depicts the morphology of Infliximab  
20 (Remicade™) crystals prepared as described in Example 34. Infliximab crystals formed in rod-shaped clusters.

Figure 3 depicts the morphology of Rituximab (Rituxan™) crystals prepared as described in Example  
28. Rituximab formed cube-shaped crystals.

25                    Figure 4 depicts the morphology of Rituximab (Rituxan™) crystals prepared as described in Example 26. Rituximab formed small needle-like crystals.

Figure 5 depicts the morphology of Trastuzumab (Herceptin™) crystals prepared as described  
30 in Example 31. Trastuzumab formed short needle-like crystals.