

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 585**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08253381 .1**

96 Fecha de presentación: **17.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2050765**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Procedimiento de uso en anticuerpos monoclonales que se adaptan al ser humano**

30 Prioridad:
19.10.2007 US 875416

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2012

73 Titular/es:
Janssen Biotech, Inc.
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:
Raghunathan, Gopalan

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

ES 2 387 585 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de uso en anticuerpos monoclonales que se adaptan al ser humano

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para seleccionar marcos de región variable humana para su uso en la adaptación al ser humano de anticuerpos monoclonales no humanos, tales como anticuerpos de roedores. Los marcos pueden ser de origen en línea germinal o somático.

Antecedentes de la invención

10 La adaptación al ser humano de anticuerpos es una expresión genérica que describe la modificación mediante ingeniería genética de anticuerpos monoclonales (mAb) xenogénicos frente a dianas terapéuticas humanas para sustituir al máximo las secuencias xenogénicas con secuencias de anticuerpo humano mientras que se conservan sus especificidades de unión a antígeno. El fin es reducir la inmunogenia de estos anticuerpos para mejorar sus propiedades terapéuticas. Los anticuerpos modificados mediante ingeniería genética generados también se conocen en la técnica como anticuerpos humanizados o con injerto de CDR.

15 Actualmente, la técnica usada más ampliamente para la adaptación al ser humano de anticuerpos se conoce como "injerto de CDR". La base científica de esta tecnología es que la especificidad de unión de un anticuerpo reside principalmente dentro de los tres bucles hipervariables conocidos como las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de sus regiones variables (regiones V) de cadena ligera y pesada, mientras que las regiones marco más conservadas (marco, FW; región marco, FR) proporcionan función de soporte estructural. Injertando las CDR en un FW seleccionado apropiadamente se puede transferir algo o toda la actividad de unión a anticuerpo al anticuerpo recombinante resultante. La primera demostración de la transferencia de especificidad mediante injerto de CDR fue para el hapteno nitrofenol (Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986)).

20 Ya que la metodología para definir las CDR se ha establecido bien, la clave para el injerto de CDR es la selección del aceptor de anticuerpo humano más apropiado para el injerto. Se han desarrollado diversas estrategias para seleccionar aceptores de anticuerpo humano con las mayores similitudes con las secuencias de aminoácidos de CDR donadoras o FW donador o con las estructuras donadoras. Todas estas estrategias de "mejor ajuste", aunque parecen muy racionales, de hecho están basadas en una suposición, es decir, un anticuerpo recombinante resultante que es lo más similar posible (en secuencia de aminoácidos o en estructura) al anticuerpo original conservará del mejor modo la actividad de unión a antígeno original. Aunque estas estrategias se han aplicado todas exitosamente para generar anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, documento WO 2005/112564, Tempest y col., Biotechnology 9: 266-71 (1991), Gorman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185 (1991), Co y col., J. Immunol. 152: 2968-76 (1994)), la hipótesis subyacente nunca se ha ensayado seriamente.

35 Un problema potencial de las estrategias de mejor ajuste es que los criterios de los mejores ajustes son matemáticos, pero no necesariamente biológicos. La adecuación medida por el grado de homología, por ejemplo, es la suma de valores numéricos asignados a restos de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico idénticas, homólogas y distintas. Aunque estos valores asignados se han validado en gran medida en muchos otros sistemas de evaluación de homología, las diferencias finas que pueden ser no significativas para otros sistemas podrían ser importantes para calcular los mejores ajustes en la adaptación al ser humano de anticuerpos.

40 Un problema relacionado es, dados dos aceptores con un grado idéntico o muy próximo de adecuación total del donador, que su adecuación local en diferentes FR puede ser diferente. Brevemente, un modelo matemático todavía no se ha validado para satisfacer el requisito de cálculo de los mejores ajustes en la relación de donador-aceptor en la modificación por ingeniería genética de anticuerpos.

45 Una complicación adicional se refiere a las interacciones entre las dos cadenas de un anticuerpo: un aceptor de cadena pesada de mejor ajuste y un aceptor de cadena ligera de mejor ajuste pueden no ajustarse entre sí para conservar del mejor modo la actividad de unión del donador. No existe ninguna herramienta disponible para evaluar la adecuación intercadena. Los investigadores han emparejado cadenas pesadas y ligeras de varios anticuerpos frente al mismo epítipo para intentar encontrar un mejor emparejamiento. Sin embargo, esto no se ha intentado en la adaptación al ser humano de anticuerpos.

50 En teoría, todas las secuencias de línea germinal humana se han secuenciado y están disponibles para la búsqueda de FW de anticuerpo. Sin embargo, en la práctica, la mayoría de las regiones V humanas que se han usado hasta ahora en la humanización de anticuerpos son de genes de anticuerpos maduros, con frecuencia los de proteínas de mieloma. Probablemente contienen mutaciones somáticas. Estas mutaciones son únicas para el individuo de los que se han obtenido los genes reordenados y, por tanto, serán vistos como extrañas por otros individuos. Las secuencias de bases de datos de línea germinal generalmente son más adecuadas para la humanización de anticuerpos desde esta perspectiva. Sin embargo, hay solamente unas pocas docenas de genes V y menos genes J disponibles. Por tanto, en algunos casos, puede ser difícil encontrar un marco de línea germinal que sea altamente compatible con la secuencia no humana. Por el contrario, el número de secuencias de genes de anticuerpos humanos maduros disponibles es unos pocos órdenes de magnitud mayor que las secuencias de línea germinal

humana. Por tanto, es altamente probable que se pueda obtener una secuencia compatible en este mayor conjunto de datos.

Un problema del uso de genes de anticuerpos maduros para FW acceptor es que no están representadas todas las potenciales combinaciones de V-J para la cadena ligera o combinaciones de V-D-J para la cadena pesada en los genes maduros. Por tanto, pueden surgir situaciones en las que un gen V que coincide estrechamente esté ligado a un segmento J que coincide mal. La humanización del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Tac descrita por Queen y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)) es un ejemplo. La comparación de la región V_H de anti-Tac con la base de datos NBRF-PIR (<http://www.psc.edu/general/software/packages/nbrf-pir/nbrf.html>) indicó que la región V_H de la proteína de mieloma humano Eu tenía el mayor grado de homología (57% de identidad frente a VD_{JH}). Sin embargo, el marco 4 de la región V_H de Eu tiene varios aminoácidos, probablemente codificados por el segmento J_H de Eu, que son atípicos de segmentos J_H humanos. Esto dio como resultado una peor coincidencia entre el marco 4 de Eu y el de anti-Tac. La comparación separada de la región J_H de anti-Tac (el marco 4 y el extremo proximal al marco 4 de CDR3) con las secuencias de aminoácidos de los segmentos J_H humanos funcionales conocidos (de los que hay 6) indica que J_H4 humano es una coincidencia mucho mejor que J_H de Eu. Este ejemplo sugiere que las comparaciones separadas de los elementos V y J son más ventajosas que la comparación de todas las regiones variables entre secuencias de anticuerpo de roedor y de ser humano. Actualmente no está fácilmente disponible una herramienta para este tipo de comparación separada.

No todos los aminoácidos en las CDR están implicados en la unión a antígeno. Por tanto, se ha propuesto que el injerto de solamente los restos que sean críticos en la interacción antígeno-anticuerpo -el denominado injerto de restos determinantes de especificidad (injerto de SDR)- aumentará adicionalmente el contenido de secuencias de anticuerpos humanos en el anticuerpo recombinante resultante (Kashmiri y col., Methods 36: 25-34 (2005); Gonzales y col., Mol Immunol. 40: 337-49 (2004)). La aplicación de esta estrategia requiere información acerca de la estructura del anticuerpo así como de restos de contacto de anticuerpo-antígeno que con bastante frecuencia no están disponibles. Incluso cuando está disponible tal información, no existe ningún procedimiento sistemático para identificar de forma fiable las SDR y el injerto de SDR permanece hasta ahora en su mayor parte en el nivel de investigación básico.

Recientemente se ha desarrollado una estrategia novedosa denominada "barajado de marco humano" (Dall'Acqua y col., Methods 36: 43-60 (2005)). Esta técnica trabaja ligando fragmentos de ADN que codifican CDR con fragmentos de ADN que codifican FR1, FR2, FR3 y FR4 humanas, generando de este modo una biblioteca de todas las combinaciones entre CDR donadoras y FR humanas. Aunque esta estrategia se ha aplicado exitosamente, existen dos potenciales problemas. En primer lugar, las FR del anticuerpo resultante, aunque todas son de fuentes humanas, probablemente serán de FW no contiguos y, por tanto, no naturales. Todavía está por ver si estos FW no naturales serán inmunógenos en seres humanos. En segundo lugar, la biblioteca, en teoría, puede ser prohibitivamente grande y establece una alta demanda de fuentes de exploración y ensayo.

Por tanto, existe una necesidad de procedimientos mejorados para preparar anticuerpos adaptados al ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un diagrama de flujo para la adaptación al ser humano de una cadena pesada de anticuerpo de ratón usando una base de datos de cadenas pesadas de línea germinal humana.

La Fig. 2 muestra un diagrama de flujo para la adaptación al ser humano de una cadena ligera de anticuerpo de ratón usando una base de datos de cadenas ligeras de línea germinal humana.

La Fig. 3 ilustra la recombinación de gen de anticuerpo para regiones variables de cadena pesada y ligera.

La Fig. 4 muestra un diagrama de flujo de algoritmo de modelado de anticuerpo. Si no está disponible ningún molde estructural común, las cadenas se modelan individualmente y se combinan. pdb indica la base de datos Protein Data Bank (www.pdb.org).

La Fig. 5 muestra una comparación de regiones V_H entre C7 adaptado al ser humano e infliximab quimérico (V_H de ratón). Las líneas discontinuas indican restos idénticos.

La Fig. 6 muestra una comparación de regiones V_L entre C7 adaptado al ser humano e infliximab quimérico (V_L de ratón). Las líneas discontinuas indican restos idénticos.

La Fig. 7 muestra curvas de titulación de unión de ELISA para C7 adaptado al ser humano de longitud completa, infliximab sintetizado en la empresa (C3) y la marca comercial REMICADE[®] de infliximab.

La Fig. 8 muestra una comparación de regiones V_H entre el anticuerpo B21M adaptado al ser humano y de ratón anti-RSV F101. Las líneas discontinuas indican restos idénticos.

La Fig. 9 muestra una comparación de regiones V_L entre el anticuerpo B21M adaptado al ser humano y de ratón anti-RSV F101. Las líneas discontinuas indican restos idénticos.

La Fig. 10 muestra el ELISA de unión de proteína F para anticuerpo quimérico anti-RSV F101, la marca SYNAGIS[®] de pavilzumab y B21M adaptado al ser humano.

La Fig. 11 muestra la comparación de ELISA de unión de proteína F de las cinco moléculas adaptadas a ser humano B26A, B26, B28A, B28B y B12M.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es un procedimiento para seleccionar secuencias de anticuerpo de línea germinal humana para su uso en la preparación de moléculas de anticuerpo adaptadas al ser humano que comprende las etapas de:

- 5 a. obtener una secuencia peptídica para una región variable de anticuerpo no humano;
- b. delinear las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR) de la secuencia peptídica de región variable de anticuerpo no humano;
- c. proporcionar una biblioteca de secuencias peptídicas de gen de anticuerpo de línea germinal humana que comprende sub-bibliotecas de genes VH, VK, V λ , JH, JK y J λ ;
- 10 d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas de la biblioteca de gen de línea germinal humana que tengan máximas similitudes de secuencia de CDR y FR con el anticuerpo no humano;
- e. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo de línea germinal humana seleccionadas en la etapa d basándose en:
 - e1. comparación de compatibilidades de longitud de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano; y
 - e2. similitudes de secuencia de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano;
- f. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena ligera de anticuerpo de línea germinal humana seleccionadas en la etapa d basándose en:
 - 20 f1. comparación de compatibilidades de longitud de los bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano; y
 - f2. similitudes de secuencia de los bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano;
- g. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J de cadena pesada de la sub-biblioteca del gen JH de línea germinal humana basándose en las similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones del gen JH;
- 25 h. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J para la cadena ligera de las sub-bibliotecas del gen JK y J λ de línea germinal humana basándose en similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones del gen JK y J λ ;
- i. combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa e y una selección de FR4 de la etapa g para cadenas pesadas humanas para seleccionar secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano; y
- 30 j. combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa f y una selección de FR4 de la etapa h para cadenas ligeras humanas para seleccionar secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano.
- 35 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para seleccionar secuencias de anticuerpo humano que contengan mutación somática para su uso en la preparación de moléculas de anticuerpo adaptados al ser humano que comprende las etapas de:
 - a. obtener una secuencia peptídica para una región variable de anticuerpo no humano;
 - 40 b. delinear las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR) de la secuencia peptídica de región variable de anticuerpo no humano;
 - c. proporcionar una biblioteca de secuencias peptídicas de gen de anticuerpo somático humano;
 - d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas de la biblioteca de gen somático humano que tengan las máximas similitudes de secuencia de CDR y FR con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo no humano;
 - 45 e. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo somático humano seleccionadas en la etapa d para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano basándose en:
 - e1. comparación de compatibilidades de longitud de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y
 - e2. similitudes de secuencia de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y
 - 50 f. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena ligera de anticuerpo somático humano seleccionadas en la etapa d para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano basándose en:
 - f1. comparación de compatibilidades de longitud de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y
 - 55 f2. similitudes de secuencia de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo la referencia a "un anticuerpo adaptado al ser humano" es una referencia a uno o más anticuerpos adaptados al ser humano.

A menos que se defina de otro modo, todas las expresiones técnicas y científicas usadas en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la invención, en el presente documento se describen procedimientos ilustrativos.

El término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulina o moléculas de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo. En general, los anticuerpos son proteínas o polipéptidos que muestran especificidad de unión por un antígeno específico. Los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, concretamente kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales, concretamente IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante de cadena pesada. La IgA y la IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

Los anticuerpos son proteínas secretadas expresadas constitutivamente y secretadas por células plasmáticas. Los anticuerpos pueden producirse también usando células plasmáticas inmortalizadas mediante procedimientos convencionales, tales como generación de hibridoma o mediante transfección de genes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo en un linfocito B inmortalizado, tal como una célula de mieloma u otros tipos celulares, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células vegetales y células de insecto.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, tales como moléculas de scFv donde las cadenas pesada variable y ligera variable están conectadas como una única cadena polipeptídica mediante un engarce y anticuerpos multiespecíficos formados por al menos dos anticuerpos intactos.

Los anticuerpos humanizados, adaptados al ser humano e injertados con CDR son anticuerpos monoclonales quiméricos que contienen CDR de una especie no humana y regiones marco de región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano.

La presente invención proporciona un procedimiento novedoso de adaptación al ser humano basada en estructura basado en estructuras moleculares, modelado y secuencias para la modificación mediante ingeniería genética para el ser humano de moléculas de anticuerpo. El procedimiento da como resultado moléculas de anticuerpo humano, cuyas secuencias son altamente similares a las secuencias humanas (para reducir la potencial inmunogenia) y cuyas afinidades por el antígeno son comparables al anticuerpo parental no humano, típicamente de ratón. Las etapas en el procedimiento comprenden comparar una secuencia de ratón con una base de datos de secuencias humanas para homología global de toda la secuencia y para diferentes regiones locales y aplicar varios filtros para identificar secuencias humanas candidatas. Los criterios de selección para tales filtros incluyen la conservación de las longitudes de bucle de CDR de ratón en secuencias humanas, homologías de secuencia en bucles y opcionalmente la aplicación de varios rasgos de reconocimiento explícitos y derivables determinados mediante construcción de modelos moleculares de anticuerpos.

Se conoce de forma común que la transferencia de CDR de un anticuerpo no humano a un marco humano da como resultado una reducción de la unión al antígeno. La afinidad reducida se debe a la pérdida en el reconocimiento molecular entre el antígeno y el anticuerpo adaptado al ser humano. La causa subyacente para la pérdida de energía libre son los cambios estructurales en la superficie del anticuerpo en la interfaz alterada de anticuerpo-antígeno. Esta interfaz implica las 6 CDR, 3 en cada VL y VH y también cambios estructurales inducidos en la región debido a empaquetamiento alterado de las nuevas VL y VH. Para ganar algo de la afinidad perdida, varios grupos tienen restos mutados en los marcos humanos a restos de ratón, denominadas en la bibliografía retromutaciones. El procedimiento de adaptación al ser humano descrito en la presente solicitud no requiere introducción de

retromutaciones. La retención de afinidad de los anticuerpos adaptados al ser humano se debe a la lógica usada en la selección de los marcos. Los marcos se eligen basándose no sólo en las identidades de secuencia globales a lo largo de toda la molécula, sino también en la longitud de bucle y las identidades de secuencia de los 6 bucles de CDR, 3 en cada VL y VH. Tal lógica garantiza las mínimas alteraciones en la superficie de reconocimiento del anticuerpo y, como consecuencia, la afinidad del anticuerpo por el antígeno cuando se pasa de un anticuerpo no humano a uno adaptado al ser humano.

Una combinación de criterios de secuencia y basados en estructura se usa en los procedimientos de la invención. Los procedimientos de la invención incluyen procedimientos de extracción y análisis de secuencias y estructuras en bases de datos, tales como la base de datos de inmunoglobulina humana en NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos de inmunoglobulina de línea germinal humana (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) y la base de datos estructural de proteínas (<http://www.rcsb.org>).

Las secuencias de gen V y J de línea germinal se descargaron de la base de datos VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). VBase es un directorio extenso de todas las secuencias de región variable de línea germinal humana recopilado de más de mil secuencias publicadas, incluyendo aquellas en las publicaciones actuales de las bibliotecas de datos de Genbank y EMBL. La base de datos se ha desarrollado a lo largo de varios años en el MRC Centre for Protein Engineering como una extensión del trabajo de la secuenciación y mapeo de genes de anticuerpos humanos. La base de datos contiene secuencias de genes V y J de cadena pesada y ligera. Un marco consiste en cuatro regiones marco (FR) cortas. Como se ve en la Fig. 3, FR1, FR2 y FR3 junto con CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 están codificadas por el fragmento del gen V de línea germinal, mientras que FR4 está codificada por el fragmento del gen J de línea germinal. Para la búsqueda de secuencias no humanas frente a secuencias de anticuerpos humanos que contienen mutaciones somáticas se puede usar la base de datos de inmunología humana de NCBI (ncbi.nlm.nih.gov).

Existen dos sistemas de asignaciones de CDR para anticuerpos que se usan ampliamente para la delineación de secuencia. La definición de CDR de Kabat está basada en la variabilidad de secuencia de anticuerpos. La definición de CDR de Chothia está basada en las estructuras tridimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. En el procedimiento de la invención se usa un consenso de los dos procedimientos para definir las CDR. En el caso de las CDR de cadena ligera se usa la definición de Kabat. En el caso de la CDR3 de cadena pesada, ambas definiciones de Kabat y Chothia son idénticas y se puede usar cualquiera. En el caso de la CDR1 de cadena pesada, la definición de Kabat comienza ocho restos detrás de la primera cisteína, mientras que la definición de Chothia comienza tres restos después de esta cisteína. En este caso se usó la definición de Chothia. La definición usa un patrón finito para CDR1 que es una W seguida de un aminoácido hidrófobo, tal como V, I o A. La definición de Chothia termina 4 restos antes para esta CDR. En este caso se usó el patrón de Kabat para la definición de extremo de CDR2. En el caso de VH-CDR2 se usó la definición de Kabat. Sin embargo, en la mayoría de las estructuras de anticuerpo esta definición basada en secuencia asigna una porción de FR3 como perteneciente a CDR2. Por tanto, se podría usar también una versión más corta de esta CDR, que termina 7 restos antes en la región C-terminal de esta CDR. En algunos casos se construye un modelo molecular de la región variable de ratón. El modelo se usa como una guía para las asignaciones de bucle de CDR. La Tabla 1 muestra asignaciones de CDR ilustrativas que se pueden usar en el procedimiento de la invención.

Tabla 1

Bucles de CDR	Definición de inicio	Definición de extremo
VL-CDR1	Kabat	Kabat
VL-CDR2	Kabat/Chothia	Kabat
VL-CDR3	Kabat	Kabat
VH-CDR1	Chothia	Kabat
VH-CDR2	Kabat	Kabat, Kabat-7
VH-CDR3	Kabat/Chothia	Kabat/Chothia

Las anteriores definiciones de CDR se usan para identificar secuencias humanas que tienen la mejor similitud global y también las máximas compatibilidades de longitud y similitudes de secuencia en los bucles de CDR con la secuencia no humana.

En las Figs. 1 y 2 se muestran diagramas de flujo del procedimiento de la invención para la selección de cadenas pesada y ligera de línea germinal humana.

El procedimiento de la invención asegura la selección de secuencias humanas que satisfacen los siguientes criterios:

1. Las secuencias humanas tienen identidad significativa con la secuencia de ratón a lo largo de toda la longitud de la molécula, abarcando los 4 marcos y 3 CDR.
2. Las secuencias humanas tienen la máxima conservación de longitudes de CDR 1, 2, y 3, es decir, un alineamiento de secuencias humanas y de ratón tiene el menor número de deleciones e inserciones en las 3 CDR.
3. Entre las secuencias en la base de datos humana, las secuencias seleccionadas tienen homología significativa con la secuencia de ratón en las CDR 1, 2 y 3.

En una realización del procedimiento para seleccionar secuencias de anticuerpo humano para su uso en la preparación de moléculas de anticuerpo adaptadas al ser humano, las etapas comprenden lo siguiente:

- a. Obtener una secuencia peptídica de una región variable de anticuerpo no humano –típicamente, el anticuerpo no humano es de un roedor, tal como un ratón o una rata. La información de secuencia peptídica puede deducirse de las secuencias de nucleótidos de los genes de región variable de anticuerpo no humano. Estos genes se pueden aislar, clonar y secuencias mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.
- b. Delinear las CDR y FR de la secuencia peptídica de región variable de anticuerpo no humano.
- c. Proporcionar una biblioteca de secuencias peptídicas de gen de anticuerpo de línea germinal humana que comprende sub-bibliotecas de gen VH, VK, V λ , JH, JK y J λ .
- d. Seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas de la biblioteca de gen de línea germinal humana que tengan máximas similitudes de CDR y FR con el anticuerpo no humano -- las secuencias no humanas se buscan para similitud frente a la base de datos de gen de línea germinal a lo largo de toda la longitud usando el programa BLAST (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)) y se seleccionan los mejores candidatos con las mejores puntuaciones de BLAST. Esta etapa se lleva a cabo para las cadenas pesada y ligera. Se busca una cadena pesada no humana frente a genes VH de línea germinal humana; se busca la cadena ligera no humana frente a sub-bibliotecas de gen VK y V λ de línea germinal humana.
- e. Seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano seleccionadas en la etapa d basándose en la comparación de las compatibilidades de longitudes de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano y similitudes de secuencia de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano -- se usa una puntuación compuesta para evaluar los anteriores dos criterios. Se usa una matriz de mutación convencional, tal como la matriz de sustitución BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992)) para puntuar los alineamientos de las regiones CDR de secuencias no humanas y humanas y se aplica una gran penalización si existe una inserción y/o deleción en los bucles de CDR. El procedimiento se ha automatizado usando protocolos Pipeline Pilot™ (un entorno de desarrollo de software modular disponible en Accelrys, Inc., San Diego, CA). Opcionalmente, un usuario puede revisar las puntuaciones y los alineamientos de secuencia y elegir un conjunto de genes de línea germinal humana para su uso para FR 1, 2 y 3.
- f. Seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano seleccionadas en la etapa d basándose en la comparación de compatibilidades de longitud de bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano y similitudes de secuencia de los bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano -- se usa una puntuación compuesta para evaluar los anteriores dos criterios como se ha analizado anteriormente en la etapa e.
- g. Seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J de cadena pesada de la sub-biblioteca de gen JH de línea germinal humana basándose en las similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones del gen JH.
- h. Seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J para la cadena ligera de las sub-bibliotecas de gen JK y J λ de línea germinal humana basándose en las similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones de gen JK y J λ .
- i. Combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa e y una selección de FR4 de la etapa g para cadenas pesadas humanas para seleccionar secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano.
- j. Combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa f y una selección de FR4 de la etapa h para cadenas ligeras humanas para seleccionar secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano.

Todo el procedimiento se ha automatizado usando protocolos Pipeline Pilot™ en un entorno de flujo de trabajo visual. El usuario puede aplicar ciertos criterios definidos por el usuario al procedimiento, tales como la presentación de puntuaciones, alineamientos correspondientes y nombres de genes de línea germinal o ajustar el número de secuencias de salida.

El procedimiento de la invención se puede usar con bases de datos gen de línea germinal de anticuerpo humano o bases de datos de gen de anticuerpo humano que contiene mutaciones somáticas. En el caso del uso de una base de datos de gen de anticuerpo humano con mutaciones somáticas, las etapas e) y f) implican compatibilidades de longitud y similitudes de secuencia de las tres CDR y no existe necesidad de las etapas g) y h). Las secuencias de

cadena ligera y pesada variable obtenidas se pueden usar para generar un Fab o varios Fab. Combinando estos Fab con regiones constantes apropiadas se pueden obtener secuencias de anticuerpo monoclonal de longitud completa.

Además de los procedimientos basados en secuencia se pueden usar también los enfoques basados en estructura/modelo. Los modelos moleculares de las regiones V de anticuerpo no humano son altamente útiles para obtener rasgos estructurales de la molécula y, por tanto, para modificar mediante ingeniería genética para mejorar las propiedades de interés. La calidad del modelo es muy importante y en el caso de modelos basados en un molde estructural homólogo, el alineamiento fiable de la secuencias diana y molde es muy crítico. Véase, por ejemplo, Sali y Blundell, J. Mol. Biol. 234: 779 (1993). El diagrama de flujo mostrado en la Fig. 4 se usa para seleccionar un molde estructural para el modelado. La figura demuestra que se elige un molde basándose en la homología global de toda la secuencia de VL o VH incluyendo los 4 marcos y las 3 CDR y clasificando después las mejores coincidencias basándose en la longitud de bucle y también la similitud de secuencia de las 3 CDR.

El uso de modelos moleculares en combinación con comparaciones de secuencia es una opción útil ya que los procedimientos basados en secuencia por sí mismos pueden no capturar las propiedades funcionales que con mayor frecuencia se deben a rasgos tridimensionales que implican restos adyacentes espacialmente que están separados en la secuencia. La clasificación de Kabat basada en secuencia asigna parte del marco en la estructura del anticuerpo como perteneciente a la CDR. Los modelos moleculares se usan para delinear correctamente regiones marco y CDR y, por tanto, corregir las asignaciones basadas en secuencia. Una combinación de modelado estructural y procedimientos de análisis de secuencia usados en el presente documento es útil para la selección de marcos humanos y también para maduración por afinidad de un anticuerpo adaptado al ser humano.

La presente invención proporciona un procedimiento novedoso de adaptación al ser humano de anticuerpos. El procedimiento usa genes V y J de línea germinal humana como una fuente de secuencias de FW aceptoras, clasifica todas las moléculas aceptoras basándose en las similitudes de FW y otros criterios entre secuencias de anticuerpo no humano y de línea germinal humana y genera una biblioteca de anticuerpos adaptados al ser humano representativos.

El algoritmo definido anteriormente se puede modificar para cambiar el tamaño de la biblioteca de FW a fin de coincidir con la capacidad de exploración de laboratorio de química. Para las cadenas pesada y ligera de anticuerpo de roedor se generarán respectivamente las correspondientes bibliotecas de FW y todas las cadenas pesadas y ligeras adaptadas al ser humano se combinarán para la exploración. Por tanto, el algoritmo de estrategia de biblioteca de FW global de la invención aumenta la probabilidad de encontrar parejas favorables de cadenas pesadas y ligeras humanas con interacciones intercadena óptimas que probablemente son importantes para la conservación de la afinidad.

Después de la selección de parejas favorables de marcos de cadenas pesadas y ligeras humanas mediante los procedimientos de la invención se puede construir una molécula adaptada al ser humano que incluye cada una de las regiones CDR de la región variable no humana y las regiones marco de al menos un miembro de los marcos representativos de cadena pesada y ligera humana seleccionados, donde la nueva molécula es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano que se une al mismo antígeno que el unido por el anticuerpo no humano. Se pueden usar técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia para construir las moléculas adaptadas al ser humano. Las nuevas moléculas se pueden seleccionar después explorando cada molécula para afinidad de unión a antígeno y seleccionando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano óptimo.

El procedimiento de la invención proporciona varias ventajas frente a técnicas actuales de adaptación al ser humano. Por ejemplo, a diferencia de todas las demás estrategias basadas en estructura, tales como injerto de SDR, el procedimiento de la invención no requiere información estructural detallada de anticuerpo o complejo de antígeno-anticuerpo. Otra ventaja del procedimiento de la invención es que puede proporcionar varios anticuerpos comparables, aunque humanizados de forma distinta para el mismo donador de CDR. Esto es especialmente útil para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, permitiendo a los investigadores seleccionar un candidato líder y tener uno o más candidatos de seguimiento o de reserva.

Otra ventaja relacionada del procedimiento de la invención es que estos candidatos comparables, con sus distintas secuencias, pueden tener diferentes propiedades químicas, fisiológicas y farmacéuticas. Esto se puede usar en otros aspectos de la mejora de anticuerpo terapéutico. Por ejemplo, las CDR de anticuerpo con baja solubilidad se pueden ajustar a una biblioteca de marco humano y se puede seleccionar un buen enlazador con solubilidad mejorada de los anticuerpos resultantes.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Adaptación al ser humano de un anticuerpo monoclonal quimérico

El infliximab es un anticuerpo monoclonal IgG κ quimérico con un peso aproximado de 140 kDa. El infliximab se une

específicamente al factor de necrosis tumoral alfa (TNF_{α}) humano y está compuesto de regiones constantes humanas y variables murinas (Véase la Figura 16A y 16B de la Patente de Estados Unidos N° 5.656.272 para secuencias de aminoácidos de infliximab (cA2)) y se comercializa con el nombre comercial REMICADE®. El infliximab tiene una región variable de cadena pesada de 119 aminoácidos (SEC ID N°: 1) y una región variable de

El procedimiento de la invención se aplicó a las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de infliximab para seleccionar VH y VL de línea germinal humana. La región VH seleccionada es idéntica a la secuencia de línea germinal humana VH3 3-72 y JH4. Se compara con regiones marco de infliximab en la Fig. 5. La parte de marco de la región VL seleccionada, mostrada en la Fig. 6, es idéntica a la secuencia de línea germinal humana VK1 A10 y JK3. La secuencia de región VH seleccionada se combinó con una cadena constante humana IgG κ H, CAA75030 (con sustitución A236V). La secuencia de la región VL seleccionada se combinó con una cadena constante humana IgG κ , CAA0981.

Los anticuerpos se evaluaron para la unión a TNF_{α} humano usando un formato de ELISA. En resumen, el TNF_{α} humano se aplicó como revestimiento en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron los mAb candidatos a diversas concentraciones (de 20 a 0,2 ng/ml) y se detectó el anticuerpo unido con anti-IgG de cadena ligera kappa humana marcado con HRP (Jackson, ImmunoResearch, West Grove, PA). La curva de titulación de ELISA para el clon de longitud completa (denominado C7) se muestra en la Fig. 7 e indicó comparabilidad con el infliximab sintético de longitud completa (C3) y REMICADE®.

Las mediciones de la unión de TNF_{α} a C7 y REMICADE por BIACOR (3 pares de experimentos) se muestran en la Tabla 2 y también demuestran la comparabilidad de los dos anticuerpos.

Tabla 2

Anticuerpo	k_{as} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	K_D calc. (pM)
REMICADE®	$5,47 \pm 1,37 \times 10^5$	$9,68 \pm 5,64 \times 10^{-5}$	170
C7 adaptado al ser humano basado en estructura	$8,03 \pm 0,93 \times 10^5$	$5,63 \pm 0,94 \times 10^{-5}$	70

Ejemplo 2

Adaptación al ser humano de un anticuerpo monoclonal murino

El procedimiento de la invención se aplicó a un anticuerpo de proteína F de Virus Sincitial Respiratorio (RSV) neutralizante murino denominado 101F anti-RSV para seleccionar VH y VL de línea germinal humana para construir el anticuerpo adaptado al ser humano anti-RSV B21M. El anticuerpo 101F tiene una región variable de cadena pesada de 120 aminoácidos (SEC ID N°: 3) y una región variable de cadena ligera de 112 aminoácidos (SEC ID N°: 4).

El marco de la región VH seleccionada es idéntico a la secuencia de línea germinal humana VB_2-05 y JH4. Se compara con las regiones marco de F101 anti-RSV de ratón en la Fig. 8. La secuencia de la región VH seleccionada se combinó con una cadena constante humana P01857- IgG 1 (con sustitución V234A). El marco de la región VL seleccionada es idéntico a la secuencia de línea germinal humana VB_B3 y JK1. Se compara con las regiones marco de F101 anti-RSV de ratón en la Fig. 9. La secuencia de VL seleccionada se combinó con una cadena constante humana P01834- IgG k (con sustitución S227L).

Los anticuerpos se evaluaron para la unión al dominio extracelular de la proteína F de RSV expresada recombinantemente usando un formato de ELISA. En resumen, la proteína F de RSV humana se aplicó como revestimiento en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron los mAb candidatos a diversas concentraciones (de 10 a 0,2 ng/ml) y se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana marcado con HRP (Jackson, ImmunoResearch, West Grove, PA). La curva de titulación de ELISA para el clon B21M de longitud completa adaptado al ser humano se muestra junto con la del anticuerpo 101F y la marca de producto comercial SYNAGIS® de pavalizumab en la Fig. 10. El B21M adaptado al ser humano indicó la comparabilidad con el anticuerpo 101F de ratón y SYNAGIS®. Las mediciones de unión medidas mediante BIACOR para la unión de proteína F de RSV se muestran en la Tabla 3 y demuestran también la comparabilidad de los dos anticuerpos. B21M también muestra neutralización de virus comparable al anticuerpo quimérico anti-101F y SYNAGIS® (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Datos de resonancia de plasmón superficial y datos de neutralización de virus para B21M, Synagis y Numax

	Synagis®	Numax TM	B21M
KD (nM) (Biacore)	0,40 (+/- 0,007)	0,24 (+/- 0,09)	1,7 (+/- 0,1)
Kon	$8,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$
Koff	$3,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	16×10^{-4}
CI ₅₀ para neutralización de virus (ng/ml)	104,0 ± 0,01 (n = 103)	20,5 ± 0,01 (N=3)	13,9 ± 0,01 (n=103)

Para ensayar la validez del procedimiento se usaron cuatro cadenas ligeras adicionales que se seleccionaron como mejores coincidencias en el procedimiento de adaptación al ser humano para construir anticuerpos anti-RSV adaptados al ser humano. Los cuatro marcos son idénticos a las secuencias humanas VB_A17, VB_A10, gi:20150128 y VB_A3. Las primeras dos secuencias y la cuarta secuencia son de la base de datos de línea germinal humana y la tercera es una secuencia Hulg. Estas cuatro VL en combinación con las anteriores VH se denominan B21M, B26A, B26B, B28A y B28B. Estas cuatro moléculas tienen perfiles de unión similares a B21M (véase la Fig. 11).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar secuencias de anticuerpo humano para su uso en la preparación de moléculas de anticuerpo adaptadas al ser humano que comprende las etapas de:

- a. obtener una secuencia peptídica para una región variable de anticuerpo no humano;
- b. delinear las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR) de la secuencia peptídica de región variable de anticuerpo no humano;
- c. proporcionar una biblioteca de secuencias peptídicas de gen de anticuerpo de línea germinal humana que comprende sub-bibliotecas de genes VH, VK, V λ , JH, JK y J λ ;
- d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas de la biblioteca de gen de línea germinal humana que tengan máximas similitudes de secuencia de CDR y FR con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo no humano;
- e. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo de línea germinal humana seleccionadas en la etapa d basándose en:

- e1. comparación de compatibilidades de longitud de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano; y
- e2. similitudes de secuencia de los bucles de CDR1 y CDR2 con el anticuerpo no humano;

f. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena ligera de anticuerpo de línea germinal humana seleccionadas en la etapa d basándose en:

- f1. comparación de compatibilidades de longitud de los bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano; y
- f2. similitudes de secuencia de los bucles de CDR1, CDR2 y una parte de CDR3 con el anticuerpo no humano;

g. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J de cadena pesada de la sub-biblioteca del gen JH de línea germinal humana basándose en las similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones del gen JH;

h. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas del gen J para la cadena ligera de las sub-bibliotecas del gen JK y J λ de línea germinal humana basándose en similitudes de secuencia entre el marco 4 del anticuerpo no humano y las regiones de gen JK y J λ ;

i. combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa e y una selección de FR4 de la etapa g para cadenas pesadas humanas para seleccionar secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano; y

j. combinar una selección de FR 1, 2 y 3 de la etapa f y una selección de FR4 de la etapa h para cadenas ligeras humanas para seleccionar secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano.

2. Un procedimiento para seleccionar secuencias de anticuerpos humanos que contienen mutaciones somáticas para su uso en la preparación de moléculas de anticuerpo adaptadas al ser humano que comprende las etapas de:

- a. obtener una secuencia peptídica para una región variable de anticuerpo no humano;
- b. delinear las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR) de la secuencia peptídica de región variable de anticuerpo no humano;
- c. proporcionar una biblioteca de secuencias peptídicas de gen de anticuerpo somático humano;
- d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas de la biblioteca de gen somático humano que tengan las máximas similitudes de secuencia de CDR y FR con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo no humano;
- e. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo somático humano seleccionadas en la etapa d para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano basándose en:

- e1. comparación de compatibilidades de longitud de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y
- e2. similitudes de secuencia de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y

f. seleccionar un subconjunto de las secuencias de cadena ligera de anticuerpo somático humano seleccionadas en la etapa d para su uso en la preparación de anticuerpos adaptados al ser humano basándose en:

- f1. comparación de compatibilidades de longitud de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano; y
- f2. similitudes de secuencia de bucles de CDR1, CDR2 y CDR3 con el anticuerpo no humano.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 que comprende además la etapa de construcción de una nueva molécula adaptada al ser humano que incluye cada una de las regiones CDR de la región variable y regiones marco

no humanas de al menos un miembro de los marcos representativos de cadena pesada y ligera humanos seleccionados, en el que la nueva molécula es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano que se une al mismo antígeno que el unido por el anticuerpo no humano.

- 5 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo adaptado al ser humano es un anticuerpo monoclonal de longitud completa.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo monoclonal de longitud completa es del tipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgD, IgE o IgA.

Fig. 1

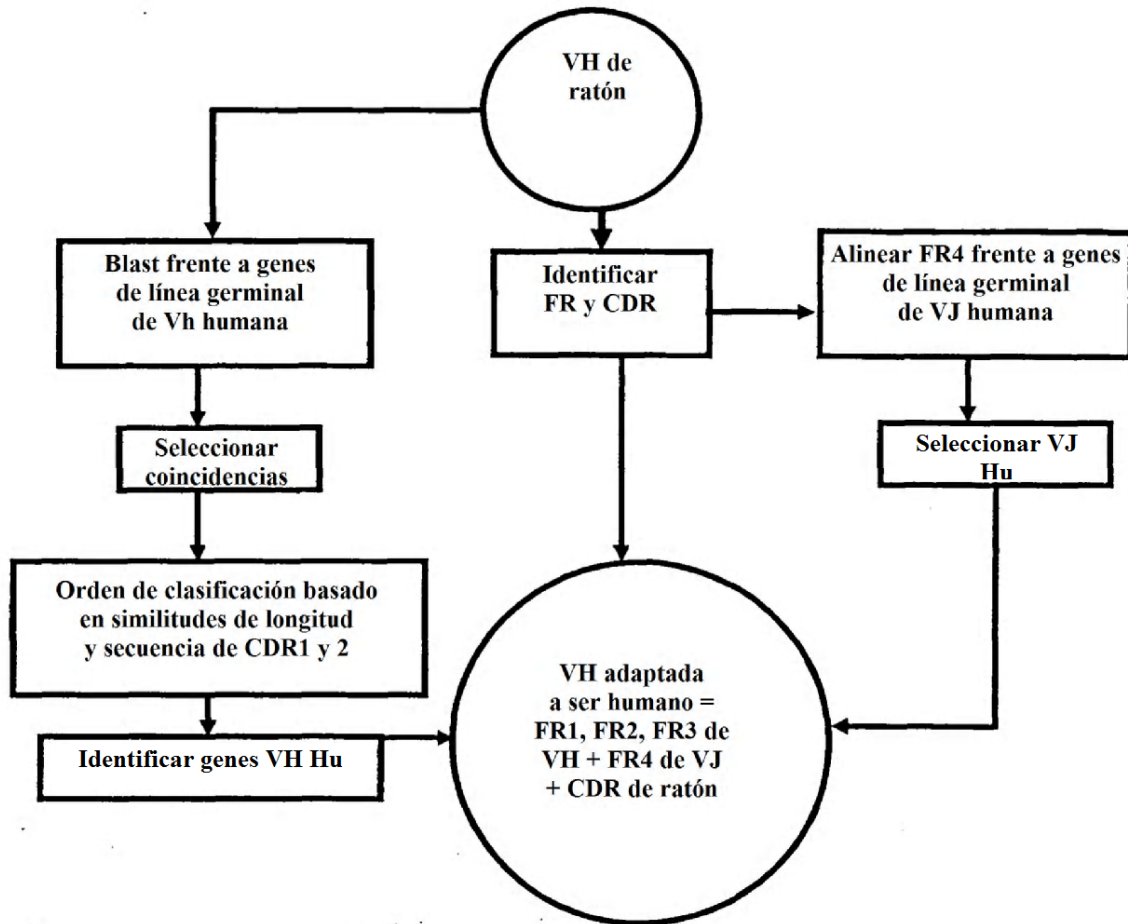


Fig. 2

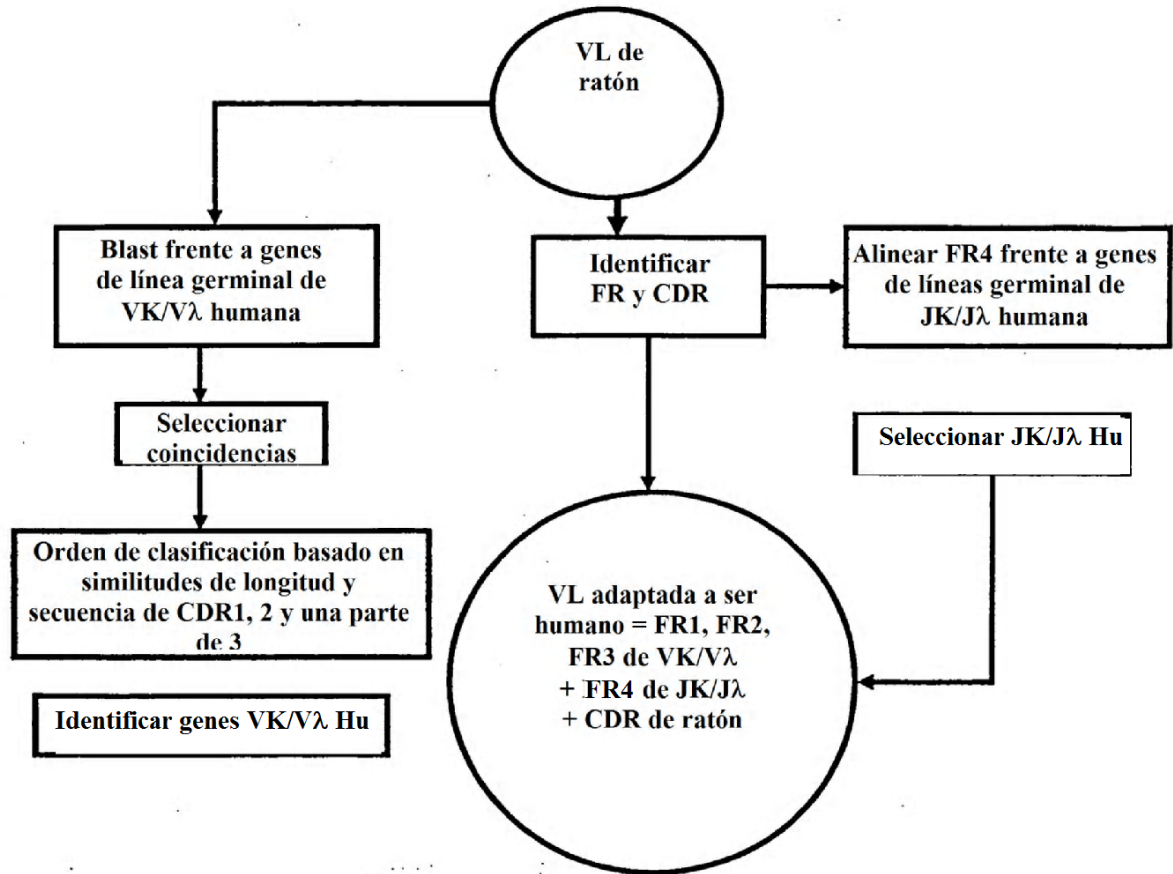


Fig. 3

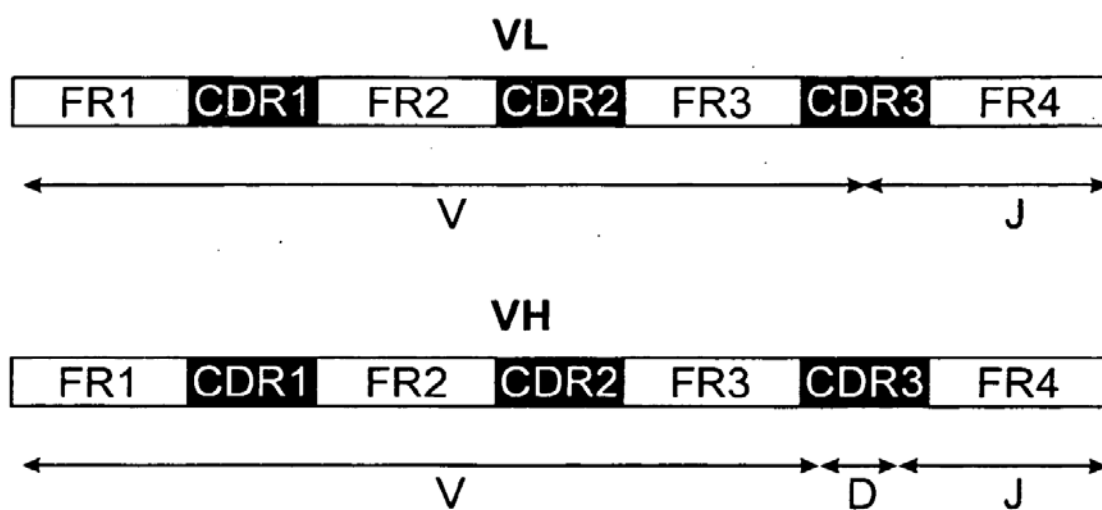


Fig. 4

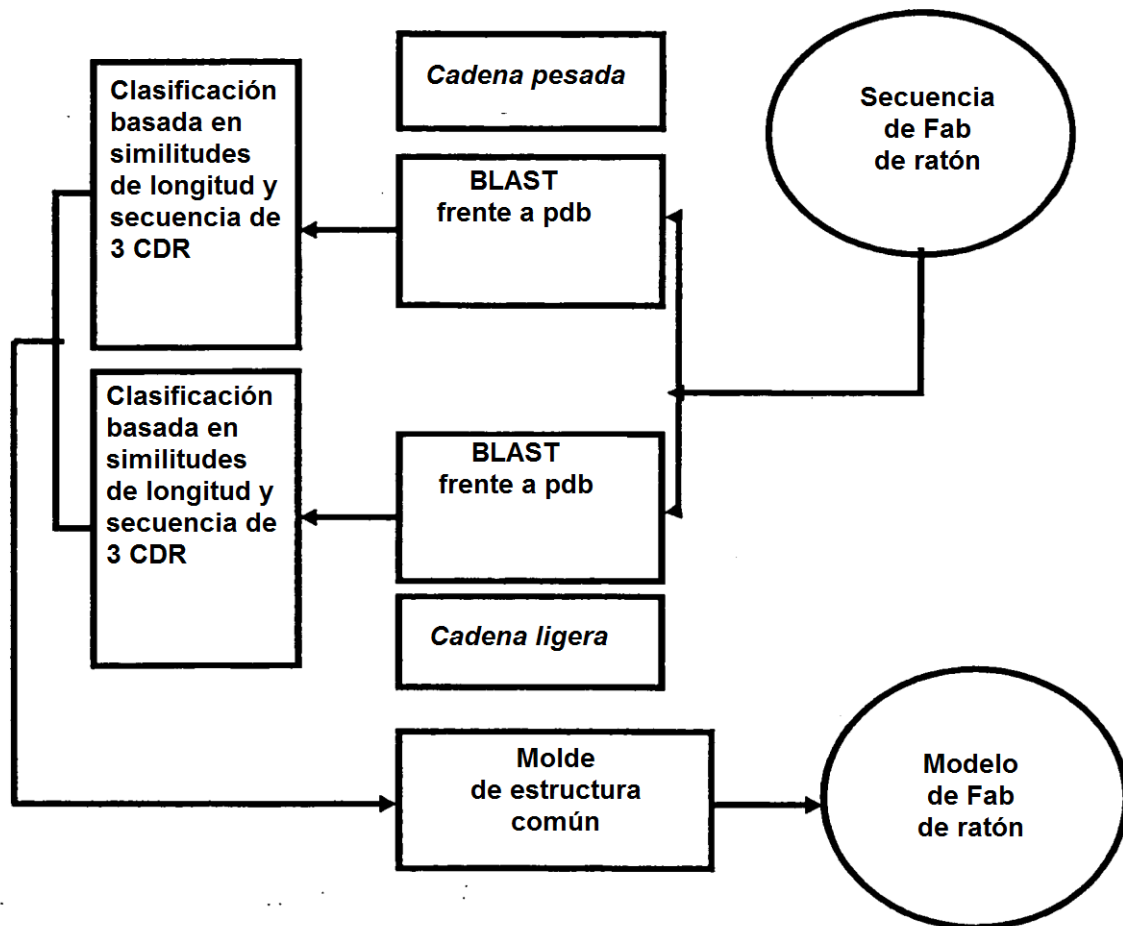


Fig. 5

FR1	
C7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID N°: 5)
Infliximab	--K-E-----MK---V--
FR2	
C7	WVRQAPGKGLEWIG (SEC ID N°: 6)
Infliximab	----S-E-----VA
FR3	
C7	RFIISRDDNKNSLYLEMNSLKTEDTAEYYCAR (SEC ID N°: 7)
Infliximab	--T-----S-SAV--Q-TD-R-----GV---S-
FR4	
C7	WGQGTLVTVS (SEC ID N°: 8)
Infliximab	-----TL---

Fig. 6

FR1	
C7	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC (SEC ID N°: 9)
Infliximab	D-L-----AIL--S-G-RVSFS-
FR2	
C7	WYQQKPDQSPKLLIK (SEC ID N°: 10)
Infliximab	-----RTNG--R-----
FR3	
C7	GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLEAEDAATYYC (SEC ID N°: 11)
Infliximab	-I-----LS-NTV-S--I-D---
FR4	
C7	FGPGTKVDIK (SEC ID N°: 12)
Infliximab	--S--NLEV-

Fig. 7

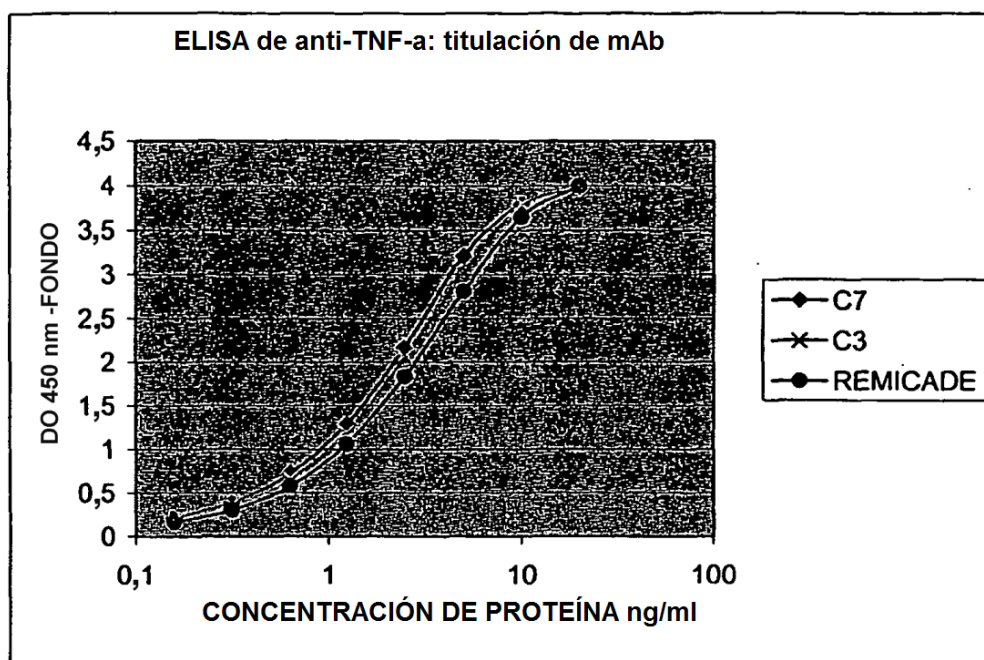


Fig. 8

FR1	
B21M	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS (SEC ID N°: 13)
F101 murino	-V-----GILQ-S---S---S--
FR2	
B21M	WIRQPPGKALEWLA (SEC ID N°: 14)
F101 murino	-----S--G-----
FR3	
B21M	RLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR (SEC ID N°: 15)
F101 murino	----S-----R---F-KI-SV-TA-----
FR4	
B21M	WGQGTLVTVSS (SEC ID N°: 16)
F101 murino	-----A

Fig. 9

FR1	
B21M	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEC ID N°: 17)
F101 murino	---L---A-----Q---F-
FR2	
B21M	WYQQKPGQPPKLLIY (SEC ID N°: 18)
F101 murino	-F-----
FR3	
B21M	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEC ID N°: 19)
F101 murino	-I-A--T-----NIHPVEE--A-T---
FR4	
B21M	FGQGTKVEIK (SEC ID N°: 20)
F101 murino	--G-----

Fig. 10

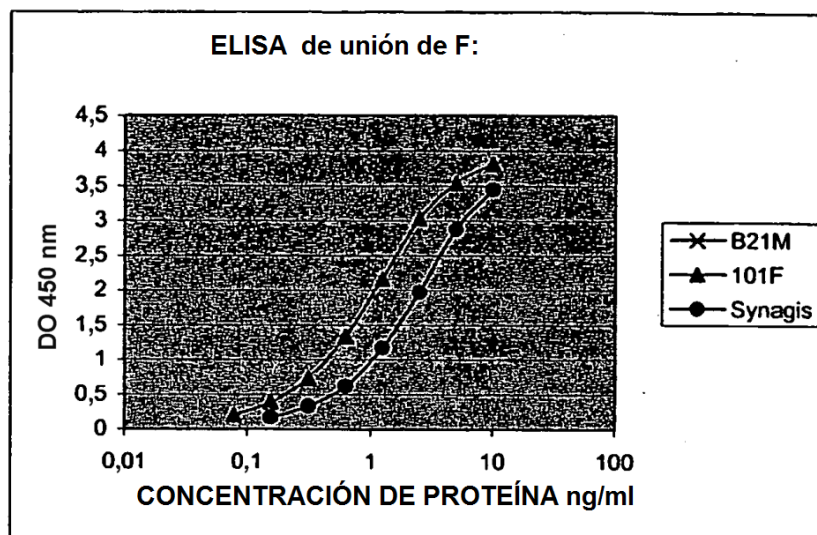


Fig. 11

