

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 393**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10798778 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2516460**

54 Título: **Agregación dependiente de secuencia**

30 Prioridad:

22.12.2009 EP 09015832

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

11.05.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KETTENBERGER, HUBERT;
KLOSTERMANN, STEFAN;
KOHNERT, ULRICH y
NEUMANN, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 535 393 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agregación dependiente de secuencia

5 En este documento se presenta un método para reducir la agregación de inmunoglobulina en soluciones concentradas revertiendo una o dos mutaciones en la cuarta región flanqueante, es decir, en el elemento-J, de una cadena pesada de inmunoglobulina al resto de aminoácido de línea germinal hidrófilo o natural.

10 Antecedentes de la invención

Debido a sus propiedades químicas y físicas, tales como peso molecular y arquitectura de dominio incluyendo modificaciones secundarias, el procesamiento corriente abajo de las inmunoglobulinas es muy complicado. Las soluciones concentradas de inmunoglobulina son necesarias no solamente para fármacos formulados sino también para intermedios en procesamiento corriente abajo (DSP) para conseguir bajos volúmenes para manipulación económica y almacenamiento de aplicación.

También la formulación final de la inmunoglobulina requiere una solución altamente concentrada. Por ejemplo, para aplicación subcutánea se requieren concentraciones de inmunoglobulina de más de 100 mg/ml, es decir, aproximadamente 150 mg/ml. Pero al menos algunas inmunoglobulinas tienden a agregarse a concentraciones no fisiológicamente altas de 100 mg/ml o más.

En el documento WO 2009/000098 se presenta una secuencia basada en modificación por ingeniería y optimización de anticuerpos de cadena sencilla.

25 Sumario de la invención

En este documento se presenta un método para reducir la agregación de inmunoglobulinas en una solución concentrada. Se ha descubierto que dos incluso una única mutación de reversión en la cuarta región flanqueante de una cadena pesada de inmunoglobulina puede reducir la formación de agregados permitiendo proporcionar una solución altamente concentrada de la variante de inmunoglobulina revertida con contenido reducido de agregados. Por lo tanto, en este documento se presentan como aspectos individuales un método para reducir la agregación de una inmunoglobulina en solución, un método para modificar una inmunoglobulina, un método para producir una inmunoglobulina, y un método para humanizar una inmunoglobulina.

35 Todos los métodos presentados en este documento comprenden las siguientes etapas:

a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de una inmunoglobulina con una secuencia de aminoácidos de referencia para conseguir un nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,

40 b) identificar las posiciones de la secuencia de aminoácidos alineada con diferentes restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina y la secuencia de aminoácidos de referencia xxxxTxxTxxx (SEC ID N° 11),

45 c) modificar la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina sustituyendo uno o al menos un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina en la posición 5 y/u 8 para el resto respectivo de treonina presente en la secuencia de aminoácidos de referencia, en la cual en la posición sustituida el resto de aminoácido sea treonina en la secuencia de aminoácidos de referencia, y en la cual el resto de aminoácido no es treonina y no es serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina,

50 d) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina modificada.

55 En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos de referencia es la secuencia de aminoácidos xxxxTxxTxxx (SEC ID N° 11) indicando x en las posiciones 1, 2, 3, 4, 7 y 9 cualquier resto de aminoácido excepto treonina y serina e indicando x en la posición 6 treonina e indicando x en la posición 10 y 11 serina, en la cual la diferencia de restos treonina en la posición 5 y/u 8 en la secuencia de aminoácidos de referencia respecto a la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de inmunoglobulina se identifica en la etapa b) y se modifica en la etapa c). En una realización de todos los aspectos presentados en este documento los métodos comprenden las siguientes etapas:

60 a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina con la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEC ID N° 02), o la secuencia de aminoácidos WGRGTLVTVSS (SEC ID N° 03), o la secuencia de aminoácidos WGQGMVTVSS (SEC ID N° 04), o la

secuencia de aminoácidos WGQGTTVTVSS (SEC ID N° 05), o la secuencia de aminoácidos WGKGTTVTVSS (SEC ID N° 06) para conseguir un nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,

5 b) identificar las posiciones de aminoácidos alineadas con diferentes restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina y la secuencia de aminoácidos de referencia,

10 c) modificar la inmunoglobulina sustituyendo un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada en la posición 5 o/y 8 para el resto de treonina respectivo presente en la secuencia de aminoácidos de referencia, en la cual el resto de aminoácido en la posición es treonina en la secuencia de aminoácidos de referencia y en la cual el resto de aminoácido en la posición no es treonina y no es serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina,

15 d) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina modificada.

20 En una realización de los aspectos presentados en este documento, los métodos comprenden como primera etapa la etapa de proporcionar o determinar la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de la cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia de referencia es la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEC ID N° 02). En una realización solamente se determina y cambia la diferencia de restos de treonina.

25 En un aspecto presentado en este documento el método es un método para producir una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina con la secuencia de aminoácidos de referencia xxxTxxTxxx (SEC ID N° 11) para conseguir un nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,

30 b) identificar las posiciones de la secuencia de aminoácidos alineada con diferentes restos de aminoácido en la posición 5 y/u 8 **11** en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina y la secuencia de aminoácidos de referencia,

35 c) modificar la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina sustituyendo un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada en una posición identificada en b) para el respectivo resto de treonina como en la secuencia de aminoácidos de referencia, en la cual el resto de aminoácido en la posición es treonina en la secuencia de aminoácidos de referencia, y en la cual el resto de aminoácido en la posición no es treonina y no es serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina,

40 d) cultivar una célula de mamífero que comprenda el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de inmunoglobulina modificada y un ácido nucleico que codifica una correspondiente secuencia de aminoácidos de cadena ligera para la expresión de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina,

45 e) recuperar la inmunoglobulina de la célula de mamífero o del medio de cultivo y producir de ese modo una inmunoglobulina.

50 En una realización, la secuencia de aminoácidos de referencia es la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEC ID N° 02), o la secuencia de aminoácidos WGRGTLTVSS (SEC ID N° 03), o la secuencia de aminoácidos WGQGMVTVSS (SEC ID N° 04), o la secuencia de aminoácidos WGQGTTVTVSS (SEC ID N° 05), o la secuencia de aminoácidos WG-KGTTVTVSS (SEC ID N° 06). La etapa de modificar la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina es sustituir un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada en una posición identificada en b), que es treonina en la secuencia de aminoácidos de referencia y que no es treonina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada, por el respectivo resto de treonina presente en la secuencia de aminoácidos de referencia. En otra realización la modificación es de al menos una posición identificada. En una realización, la secuencia de aminoácidos de referencia es la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEC ID N° 02). En una realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana o humanizada. En otra realización, la célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK. Se determina la diferencia de los restos de treonina en posición 5 y/u 8 de la secuencia de aminoácidos de referencia.

60 En este documento se presenta un método para humanizar una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina con la secuencia de aminoácidos de referencia xxxTTxTxSS (SEC ID N° 01) o xxxTxTxTx (SEC ID N° 11) para conseguir un nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,

5 b) identificar posiciones de la secuencia de aminoácidos alineada con diferentes restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina y la secuencia de aminoácidos de referencia,

10 c) humanizar la inmunoglobulina sustituyendo un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada en una posición identificada en b) por el respectivo resto de treonina o serina como en la secuencia de referencia, en la cual el resto de aminoácido en las posiciones treonina o serina en la secuencia de aminoácido de referencia, y en la cual el resto de aminoácido en la posición no es treonina y no es serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina,

15 d) proporcionar opcionalmente una secuencia de aminoácidos que codifique la inmunoglobulina humanizada.

Descripción detallada de la invención

20 Se ha descubierto que el intercambio de dos o incluso un único resto de aminoácido de treonina y/o serina a un pequeño resto de aminoácido hidrófobo o no polar, tal como isoleucina o alanina, en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina aumenta la tendencia de la inmunoglobulina a formar agregados en solución, especialmente en soluciones con alta concentración salina y/o alta concentración de inmunoglobulina. Revertiendo los restos de aminoácido intercambiados de nuevo a los restos de treonina y/o serina de origen natural se reduce de forma evidente la tendencia a forma agregados en solución, especialmente en soluciones concentradas.

25 El método presentado en este documento es un método para reducir la agregación de una inmunoglobulina en solución que comprende las siguientes etapas de:

30 - determinar si se ha cambiado uno o más restos de treonina y/o serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina comparando la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia para la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante,

35 - revertir la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina modificando al menos uno de los restos intercambiados de treonina y/o serina de nuevo al resto de treonina y/o serina de referencia y reduciendo de ese modo la agregación de una inmunoglobulina en solución.

40 El término "alienar" indica el proceso de alinear dos o más secuencias de aminoácidos para conseguir un nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos y conservación. Comprende la determinación de la homología posicional para secuencias moleculares, que implica la yuxtaposición de aminoácidos o nucleótidos en moléculas homólogas. Como resultado, las secuencias comparadas se presentan en una forma en que se muestran las regiones de mayor similitud estadística.

45 "Máximo nivel de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata de aminoácidos que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de referencia, después de alinear la secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar la identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversos modos, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias de aminoácidos, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias de aminoácidos que se están comparando. Para los propósitos de este documento, sin embargo, los valores de "% de identidad de secuencia de aminoácidos" se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 ha sido elaborado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el Número de Registro de U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están configurados por el programa ALIGN-2 y no varían.

65 En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos

dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es la cantidad de restos de aminoácido valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de restos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

En este documento se presenta un método para modificar una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- determinar si se ha cambiado uno o más restos de treonina y/o serina en la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina comparando la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia para la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante,
- revertir la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina modificando al menos uno de los restos de treonina y/o serina intercambiados de nuevo al resto de treonina y/o serina de referencia y modificando de ese modo una inmunoglobulina.

En este documento se presenta un método para humanizar una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- determinar mediante comparación de la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de una inmunoglobulina quimérica, una inmunoglobulina de CDR injertada, una inmunoglobulina con epítipo de célula-T reducido o empobrecido, o una variante de la misma con una secuencia de aminoácidos de referencia para la cuarta región flanqueante en la que uno o más restos de treonina y/o serina se han reemplazado por un resto de aminoácido diferente,
- revertir la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina modificando al menos uno de los restos intercambiados de treonina y/o serina de nuevo al resto de treonina y/o serina como en la secuencia de aminoácidos de referencia y humanizando de ese modo una inmunoglobulina.

La expresión "secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante" indica la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Esta secuencia de aminoácidos empieza con el resto de aminoácido directamente C-terminal a la región determinante de complementariedad 3 (CDR 3) de la cadena pesada de inmunoglobulina y acaba con el último resto de aminoácido del dominio variable de cadena pesada. En una realización, los restos de aminoácido de la CDR 3 de la cadena pesada de inmunoglobulina se determinan de acuerdo con Kabat.

La expresión "inmunoglobulina quimérica" indica una inmunoglobulina que comprende restos de aminoácido derivados de una inmunoglobulina de una primera especie y restos de aminoácido derivados de una segunda especie no idéntica a la primera especie. Si la especie aceptora es un ser humano entonces la inmunoglobulina quimérica es una "inmunoglobulina humanizada". Para la mayor parte, una inmunoglobulina humanizada se obtiene de una inmunoglobulina humana (inmunoglobulina receptora o aceptora), en que la secuencia de aminoácidos de una o más regiones hipervariables determinadas de acuerdo con Kabat y/o Chothia y/u otros sistemas de numeración está cambiada a la secuencia de aminoácidos de una región hipervariable de una especie no humana (inmunoglobulina donante). Una inmunoglobulina humanizada en que están reemplazadas las regiones hipervariables completas de acuerdo con Kabat y/o Chothia y/u otros sistemas de numeración de una inmunoglobulina aceptora humana por los correspondientes restos de aminoácido de una inmunoglobulina donante no humana se denomina como "inmunoglobulina de CDR injertada". Inmunoglobulinas donantes no humanas ejemplares son inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo, perro, hámster, oveja, o primate no humano, que tienen la especificidad y afinidad deseada hacia un antígeno de interés (véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documento US 5.202.238; documento US 5.204.244). En algunos casos, los restos de la región flanqueante (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, las inmunoglobulinas humanizadas pueden comprender modificaciones adicionales, por ejemplo, restos de aminoácido que no se encuentran en la inmunoglobulina aceptora o en la inmunoglobulina donante. Dichas modificaciones producen variantes de dicha inmunoglobulina receptora o donante, que son homólogas pero no idénticas a la secuencia precursora correspondiente. Una inmunoglobulina humanizada opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana.

En una realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica, o una inmunoglobulina de CDR injertada, o una inmunoglobulina con epítipo de célula-T reducido o empobrecido, o una variante de las mismas. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada humana o una variante de la misma. En una realización adicional, la región constante humana es de subclase IgG 1, o de subclase IgG4, o de subclase IgG2, o de subclase IgG3, o de la SEC ID N° 07, o de la SEC ID N° 08, o es una variante de las mismas.

En una realización, la región constante se modifica de tal modo que no puede detectarse unión del receptor Fc γ (por ejemplo, Fc γ R1IIa) y/o unión de C1q como se define a continuación. En una realización, la región constante es una región constante humana y es de subclase IgG4 humana o es una parte Fc mutada de subclase IgG 1 humana. En otra realización, la región constante es de subclase IgG 1 humana que comprende las mutaciones L234A y L235A (posiciones determinadas de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de IgG 1 humana de longitud completa, es decir, incluyendo el dominio variable). Aunque IgG4 muestra unión reducida de receptor Fc γ (Fc γ R1IIa), inmunoglobulinas de otras subclases IgG muestran fuerte unión. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, o/e His435 son restos que, si se alteran, proporcionan también unión reducida del receptor Fc γ (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En una realización, la región constante es respecto a la unión del receptor Fc γ de subclase IgG4o de subclase IgG 1 o IgG2, con una mutación en L234, L235, y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización la mutación es S228P, L234A, L235A, L235E, y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en código de aminoácidos de una letra) de la posición de aminoácido 233 a 236 de IgG 1 o EFLG de IgG4 está reemplazada por PVA). En una realización adicional, la mutación es S228P de IgG4, y L234A y L235A de IgG1. La región constante de una inmunoglobulina está directamente implicada en ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una inmunoglobulina que no se une a receptor Fc γ y/o factor del complemento C1q no provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La expresión "inmunoglobulina con epítipo de célula-T empobrecido" indica una inmunoglobulina que se modificó para retirar o reducir la inmunogenicidad eliminando los epítopos de células-T humanas (secuencias peptídicas dentro de proteínas con la capacidad de unirse a moléculas MHC de clase II). Mediante este método, se identifican interacciones entre las cadenas laterales de aminoácido del péptido y bolsillos de unión específicos con el surco de unión de MHC de clase II. Las regiones inmunogénicas identificadas se cambian para eliminar la inmunogenicidad. Dichos métodos se describen en general en, por ejemplo, el documento WO 98/52976 o en el documento WO 98/08097.

La expresión "variante de la misma" indica una inmunoglobulina que comprende modificaciones conservativas de secuencia o un patrón de glucosilación alterado. La expresión "modificaciones conservativas de secuencia" indica sustituciones de aminoácido incluyendo aquellos en que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Otro tipo de variante de la inmunoglobulina altera el patrón original de glucosilación de la inmunoglobulina. Por alteración se entiende la delección de uno o más sitios de glucosilación hallados en la inmunoglobulina, y/o la introducción de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en la inmunoglobulina. La glucosilación de inmunoglobulinas está típicamente N-ligada. N-ligada se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, donde X puede ser cualquier aminoácido, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina.

En una realización, la secuencia de referencia es la secuencia de la SEC ID N° 02 a 06, o la secuencia de la SEC ID N° 01, o la secuencia de la SEC ID N° 11. En otra realización, la determinación y reversión es de los restos de treonina reemplazados.

La invención se ejemplifica a continuación con un anticuerpo anti-IL13R α 1 y un anticuerpo anti-OX40L. Las secuencias correspondientes de aminoácidos y los métodos de producción se presentan en el documento WO 2006/072564 y el documento WO 2006/029879 (que se incorporan en este documento por referencia). Estos anticuerpos se usan solamente para ilustrar los aspectos presentados en este documento y no presentan ninguna limitación. El alcance de la invención se expone en la serie adjunta de reivindicaciones.

El anticuerpo anti-IL13R α 1 se indica a continuación como anticuerpo precursor y tiene una secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de WGQGTLVIVSS (SEC ID N° 09). La comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 01 y SEC ID N° 11 se muestra a continuación.

5
 1 1
 1 0
 xxxTTxIxSS (SEC ID N° 01), o
 xxxTxIxSS (SEC ID N° 11), a
 WGQGTLVIVSS (SEC ID N° 09)

10 Puede observarse que una diferencia entre las secuencias de aminoácidos es un resto de isoleucina en la 8ª posición de la SEC ID N° 09 en lugar del resto de treonina de la SEC ID N° 01 o SEC ID N° 11. Por lo tanto, se ha producido un anticuerpo variante en que el resto de isoleucina está revertido de nuevo a un resto de treonina.

15 Mientras que el anticuerpo precursor muestra altos niveles de formación de agregados, el anticuerpo variante revertido tiene una tendencia claramente reducida a formar agregados. En la Figura 1 se muestran las tasas de aumento de tamaño (nm/h) de agregados del anticuerpo precursor anti-IL13Rα1 a una concentración de anticuerpo de 30 mg/ml a 50°C y fuerza iónica variable. También se muestran en la Figura 1 las tasas obtenidas con un anticuerpo variante anti-IL13Rα1 en que el resto de isoleucina en la posición de aminoácido 115 (correspondiente a la 8ª posición en la SEC ID N° 01, 11 y 09) en la cuarta región flanqueante de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se ha revertido a treonina como simple y única diferencia con el anticuerpo precursor anti-IL13Rα1. La mutación de reversión individual reduce la tasa de aumento de tamaño de agregados a todas las fuerzas iónicas examinadas.

20 En la Figura 2 se muestran los cromatogramas de exclusión de tamaño analíticos de dos muestras almacenadas durante 9 semanas a 40°C en la misma formulación. Los datos respectivos se enumeran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Datos analíticos de muestras almacenadas durante 9 semanas a 40°C.

	área relativa de monómero [%]	área relativa de compuestos de bajo peso molecular [%]	área relativa de compuestos de alto peso molecular [%]	aumento relativo de HMW [%]
anticuerpo precursor anti-IL13Rα1 almacenado a -80°C (valor de referencia)	98,6	0,04	1,4	-
anticuerpo precursor anti-IL13Rα1 almacenado a 40°C durante 9 semanas	93,7	4,2	2,0	48,9
anticuerpo variante anti-IL13Rα1 almacenado a -80°C (valor de referencia)	97,3	0,1	2,5	-
anticuerpo variante anti-IL13Rα1 almacenado a 40°C durante 9 semanas	93,2	3,9	2,9	13,4

25 Puede observarse que la tendencia a formar agregados del anticuerpo variante revertido está reducida en más del 50% en comparación con el anticuerpo precursor.

30 En la Figura 3 se muestra el diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis o promedio de 9 restos del anticuerpo precursor anti-IL13Rα1. En la cuarta región flanqueante el diagrama muestra los mayores valores de hidrofobicidad para la cadena pesada completa. En la Figura 4 se muestra el diagrama de Kyte-Doolittle de la cadena pesada del anticuerpo variante anti-IL13Rα1. Puede observarse que los valores de hidrofobicidad de la cuarta región flanqueante están marcadamente reducidos en el anticuerpo variante revertido.

35 En la Figura 5 se muestra el diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis/promedio de 9 restos de un anticuerpo anti-OX40L. Puede observarse que también en este caso el valor de mayor hidrofobicidad está en la cuarta región flanqueante de cadena pesada. Analizando la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada puede determinarse un intercambio de aminoácido como se muestra a continuación.

45
 1 1
 1 0
 xxxITxTxSS (SEC ID N° 01), o
 xxxIxTxSS (SEC ID N° 11), o
 WGQGTILVTVSS (SEC ID N° 02), a
 WGQGA^LLVTVSS (SEC ID N° 10).

La reversión de este único cambio de aminoácido de nuevo al resto de treonina de la línea germinal de origen natural redujo la hidrofobicidad en el diagrama de Kyte-Doolittle en la Figura 6.

- 5 Los siguientes ejemplos, lista de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de la lista de secuencias

- 10
 SEC ID N° 01 xxxTxxTxSS – secuencia de aminoácidos de referencia
 SEC ID N° 02 WGQGTLVTVSS – secuencia de aminoácidos de FR4/elemento-J de línea germinal parcial.
 SEC ID N° 03 WGRGTLVTVSS – secuencia de aminoácidos de FR4/elemento-J de línea germinal parcial.
 SEC ID N° 04 WGQGTMTVSS - secuencia de aminoácidos de FR4/elemento-J de línea germinal parcial.
 15 SEC ID N° 05 WGQGTTVTVSS - secuencia de aminoácidos de FR4/elemento-J de línea germinal parcial.
 SEC ID N° 06 WGKGTTVTVSS - secuencia de aminoácidos de FR4/elemento-J de línea germinal parcial.
 SEC ID N° 07 secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana.
 SEC ID N° 08 secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG4 humana.
 SEC ID N° 09 WGQGTLVIVSS – secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-IL13R α 1.
 20 SEC ID N° 10 WGQGALVTVSS – secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-OX40L.
 SEC ID N° 11 xxxTxxTxSS – secuencia de aminoácidos de referencia.

Descripción de las Figuras

- 25 Figura 1 Tasa de aumento del tamaño de partícula por unidad de tiempo en una solución de 30 mg/ml de anticuerpo anti-IL13R α 1 (a) y el anticuerpo variante revertido (b) ambos en tampón histidina 20 mM, pH 6, con 0, 140 y 500 mM de NaCl a 50°C, determinado por dispersión de luz dinámica.
 Figura 2 Cromatogramas de exclusión de tamaño analíticos de dos soluciones de 30 mg/ml de anticuerpo anti-IL13R α 1 y la forma revertida ambos en presencia de NaCl 500 mM durante 15 h a 10°C.
 30 Figura 3 Diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis de 9 restos del anticuerpo precursor anti-IL13R α 1.
 Figura 4 Diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis de 9 restos del anticuerpo variante anti-IL13R α 1.
 Figura 5 Diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis de 9 restos del anticuerpo precursor anti-OX40L.
 35 Figura 6 Diagrama de Kyte-Doolittle de los restos de cadena pesada 1 a 130 con una ventana de análisis de 9 restos del anticuerpo variante anti-OX40L.

Materiales y métodos

- 40 Cromatografía analítica por exclusión de tamaño

Se determinó el contenido de especies de alto molecular (HMW), monómeros de anticuerpo y especies de bajo peso molecular (LMW) por cromatografía analítica de exclusión de tamaño usando una columna TSK 3000S WXL 7,8 x 300 mm (Tosoh, Stuttgart, Alemania). Como eluyente, se usó una solución tampón que contenía KH₂PO₄ 200 mM y KCl 250 mM a pH 7,0 a un caudal de 0,5 ml/min. Se cargó una cantidad de 150 μ g de proteína por procesamiento. La detección se consiguió mediante absorción UV a 280 nm.

- 50 Dispersión de luz dinámica (DLS)

DLS es una técnica no invasiva para medir el tamaño de partícula, típicamente en el intervalo de tamaño submicrométrico. En la presente invención se usó el aparato Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcestershire, R.U.) con una cubeta de cuarzo de temperatura controlada (25°C) para controlar un intervalo de tamaño entre 1 nm y 6 μ m. La intensidad de la luz láser dispersada devuelta se detectó a un ángulo de 173°. La intensidad fluctúa a una tasa que es dependiente de la velocidad de difusión de partículas, que a su vez está gobernada por el tamaño de partículas. Los datos de tamaños de partículas pueden por lo tanto generarse a partir de un análisis de la fluctuación en la intensidad de luz dispersada (Dahneke, B.E. (ed), Measurement of Suspended Particles by Quasielectric Light Scattering, Wiley Inc. (1983); Pecora, R., Dynamic Light Scattering: Application of Photon Correlation Spectroscopy, Plenum Press (1985)). La distribución de tamaños por intensidad se calculó usando un modo estrecho múltiple del software DTS (Malvern).

Ejemplo 1

- 65 Producción de anticuerpo variante anti-IL13R α 1

Los genes que codifican la cadena ligera y pesada del anticuerpo anti-IL13R α 1 se ensamblaron por separado en vectores de expresión de células de mamífero. De ese modo los segmentos génicos que codifican la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IL13R α 1 (V_L) y la región constante de cadena ligera- κ humana (C_L) se unieron como si fueran segmentos génicos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IL13R α 1 (V_H) y la región constante de cadena pesada- γ 1 humana (C_{H1}-Bisagra-C_{H2}-C_{H3}). Se da información general respecto a las secuencias de nucleótidos de cadenas ligera y pesada humanas de las que se obtiene el uso de codones en: Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., y Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Ed., Publicación NIH N° 91-3242 (1991). La unidad de transcripción de la cadena ligera- κ del anticuerpo anti-IL13R α 1 está compuesta por los siguientes elementos:

- el potenciador temprano inmediato y el promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- una 5'-UT sintética que incluye una secuencia Kozak,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluya el intrón de secuencia señal,
- el ADNc de cadena ligera variable del anticuerpo anti-IL13R α 1 clonado dispuesto con un sitio de restricción único BsmI en el extremo 5' y un sitio de donante de corte y ajuste y un sitio de restricción único NotI en el extremo 3',
- la región constante del gen- κ humano genómico, incluyendo el potenciador Ig- κ de ratón del intrón 2 (Picard, D., y Schaffner, W., Nature 307 (1984) 80-82), y
- la secuencia señal de κ -poliadenilación de inmunoglobulina humana ("poliA").

La unidad de transcripción de la cadena pesada- γ 1 del anticuerpo anti-IL13R α 1 está compuesta por los siguientes elementos:

- el potenciador temprano inmediato y el promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- una 5'-UT sintética que incluye una secuencia Kozak,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluya el intrón de secuencia señal,
- el ADNc de cadena pesada variable del anticuerpo anti-IL13R α 1 clonado dispuesto con un sitio de restricción único BsmI en el extremo 5' y un sitio de donante de corte y ajuste y un sitio de restricción único NotI en el extremo 3',
- la región constante génica γ 1-pesada humana genómica, incluyendo el potenciador Ig- μ de ratón (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378),
- la secuencia señal de poliadenilación de inmunoglobulina- γ 1 humana ("poliA").

Además de el casete de expresión de cadena ligera- κ o cadena pesada- γ 1 del anticuerpo anti-IL13R α 1 estos plásmidos contienen

- un gen de resistencia a higromicina,
- un origen de replicación, oriP, del virus Epstein-Barr (EBV),
- un origen de replicación del vector pUC 18 que permite la replicación de este plásmido en E. coli,
- un gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en E. coli.

Se creó un plásmido de expresión que codifica la cadena pesada- γ 1 del anticuerpo anti-IL13R α 1 variante por mutagénesis dirigida al sitio de los plásmidos de expresión del anticuerpo precursor usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ (Stratagene). Los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63 (1969) 78-85; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., y Foeller, C., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Ed., Publicación NIH N° 91-3242).

Un clon CHO transfectado de forma estable produce el anticuerpo variante anti-IL13R α 1 a 130 mg/ml. El procesamiento corriente abajo se realizó empleando tres etapas cromatográficas secuenciales: cromatografía con Proteína A, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

Ejemplo 2

Determinación de la tasa de aumento del tamaño de agregados mediante dispersión de luz dinámica

Para seguir la agregación en el tiempo, se realizaron mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) a intervalos de tiempo regulares. Con elevadas concentraciones salinas se estabilizan las interacciones hidrófobas; por tanto se espera que la agregación relacionada con la hidrofobicidad sea más pronunciada a elevadas concentraciones salinas. El cambio del tamaño de partícula promedio (radio promedio-Z) se controló como medida para la agregación de proteínas (Figura 1). Las muestras se dializaron en tampón que contenía diversas cantidades de NaCl (His/His-HCl 20 mM a pH 6,0 + NaCl 0/140/500 mM) a una concentración de proteína de 30 mg/ml. Las mediciones DLS se realizaron en un lector de placa Wyatt DynaPro en microplacas de titulación de 394 pocillos a una temperatura de 50°C.

Ejemplo 3

Ensayo de estabilidad del anticuerpo variante anti-IL13R α 1

- 5 Se realizó inducción de compuestos de alto peso molecular (HMW) dializando muestras en His/His-HCl 20 mM a pH 6,0, que contenía NaCl 0 ó 500 mM, seguido por incubación a 10°C durante 15 horas. La formación de HMW en comparación con las muestras no tratadas se controló por SEC HPLC (Figura 2),

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
<120> Agregación dependiente de secuencia

15

<130> 26504 WO
<150> EP09015832.0
<151> 22-12-2009

20

<160> 11
<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de referencia

35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Xaa indica cualquier resto de aminoácido excepto serina y treonina

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Thr Xaa Thr Xaa Ser Ser
1 5 10

40

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 2

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

50

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

<400> 3

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

60

<210> 4
<211> 11

ES 2 535 393 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 4

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

10
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 5

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

20
<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25
<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30
<400> 7

ES 2 535 393 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

ES 2 535 393 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

ES 2 535 393 T3

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

5 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región FR4 de anticuerpo anti-IL13R α 1 humanizado
 <400> 9

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

15 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región FR4 de anticuerpo anti-OX40L humanizado
 <400> 10

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

25 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de referencia

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa indica cualquier resto de aminoácido excepto serina y treonina

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa indica treonina

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa indica cualquier resto de aminoácido excepto serina y treonina

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)

ES 2 535 393 T3

<223> Xaa indica cualquier resto de aminoácido excepto serina y treonina

<220>

<221> MISC_FEATURE

5

<222> (10)..(11)

<223> Xaa indica serina

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa
1 5 10

10

REIVINDICACIONES

1. Método para proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas

- 5
- a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de una inmunoglobulina con la secuencia de referencia xxxxTxxTxxx (SEC ID N° 11) para conseguir el nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,
- 10 b) identificar las posiciones de aminoácidos alineadas con un pequeño resto de aminoácido hidrófobo o no polar en la posición 5 o/y 8 en la cuarta región flanqueante de cadena pesada,
- c) modificar la inmunoglobulina sustituyendo un resto de aminoácido en la cuarta región flanqueante de cadena pesada en una posición identificada en b), que es treonina en la secuencia de referencia, y que no es treonina en la cuarta región flanqueante de cadena pesada, por el respectivo resto de treonina como en la secuencia de referencia,
- 15 d) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina.

2. Método para producir una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas

- 20 a) alinear la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de la inmunoglobulina con la secuencia de referencia xxxxTxxTxxx (SEC ID N° 11) para conseguir el nivel máximo de identidad de secuencia de aminoácidos,
- b) identificar las posiciones de aminoácidos alineadas con un pequeño resto de aminoácido hidrófobo o no polar en la posición 5 o/y 8 en la cuarta región flanqueante de cadena pesada,
- 25 c) modificar la inmunoglobulina sustituyendo un resto de aminoácido en la cuarta región flanqueante de cadena pesada en una posición identificada en b), que es treonina en la secuencia de referencia, y que no es treonina en la cuarta región flanqueante de cadena pesada, por el respectivo resto de treonina como en la secuencia de referencia,
- d) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina modificada,
- 30 e) cultivar una célula de mamífero que comprende el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de inmunoglobulina modificada y un ácido nucleico que codifica una correspondiente secuencia de aminoácidos de cadena ligera para la expresión de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina,
- f) recuperar la inmunoglobulina de la célula de mamífero o el medio de cultivo y producir de ese modo una inmunoglobulina.
- 35

3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la secuencia de referencia es la secuencia WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 02), o la secuencia WGRGLTVTVSS (SEC ID N° 03), o la secuencia WGQGT-MTVTVSS (SEC ID N° 04), o la secuencia WGQGTTVTVSS (SEC ID N° 05), o la secuencia WGKGTTVTVSS (SEC ID N° 06).

40

4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el método comprende una primera etapa que proporciona o determina la secuencia de aminoácidos de la cuarta región flanqueante de cadena pesada de inmunoglobulina.

45 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana o humanizada.

50 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica, o una inmunoglobulina de CDR-injertada, o una inmunoglobulina con epítopo de célula-T empobrecido, o una variante de las mismas.

7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado por que** la célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK.

Fig. 1

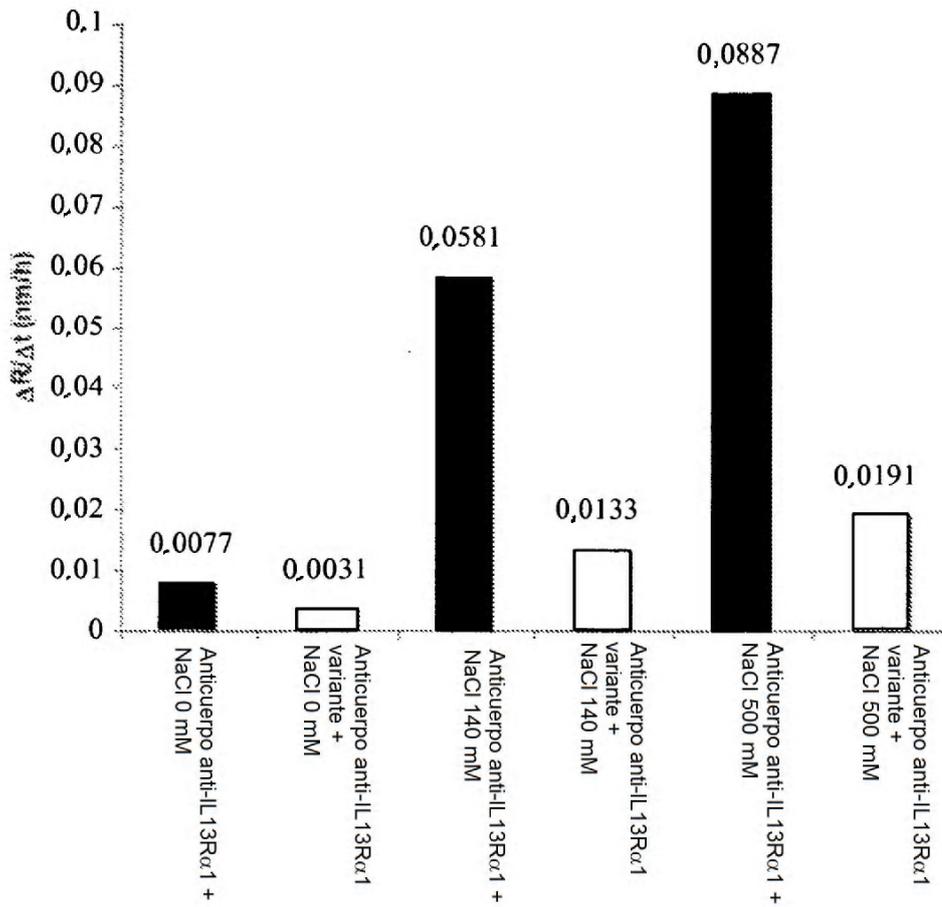


Fig. 2

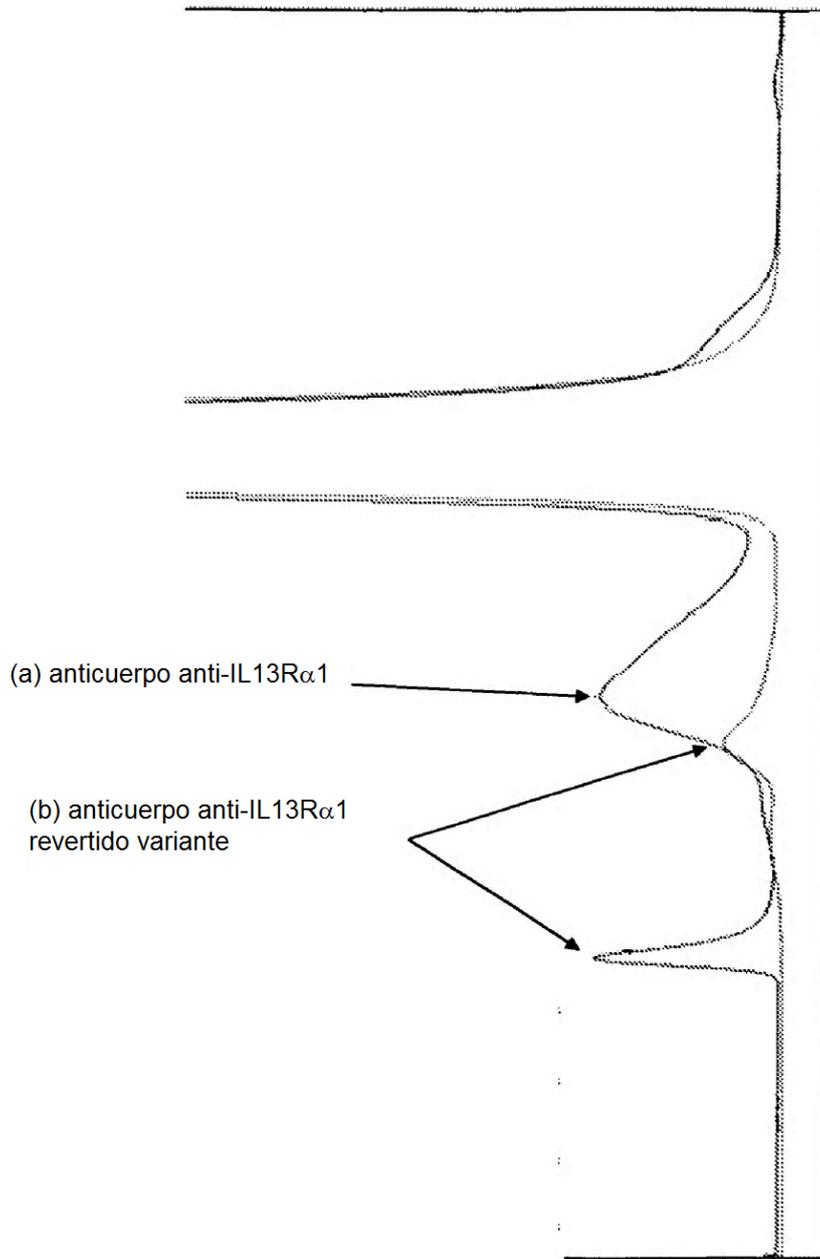


Fig. 3

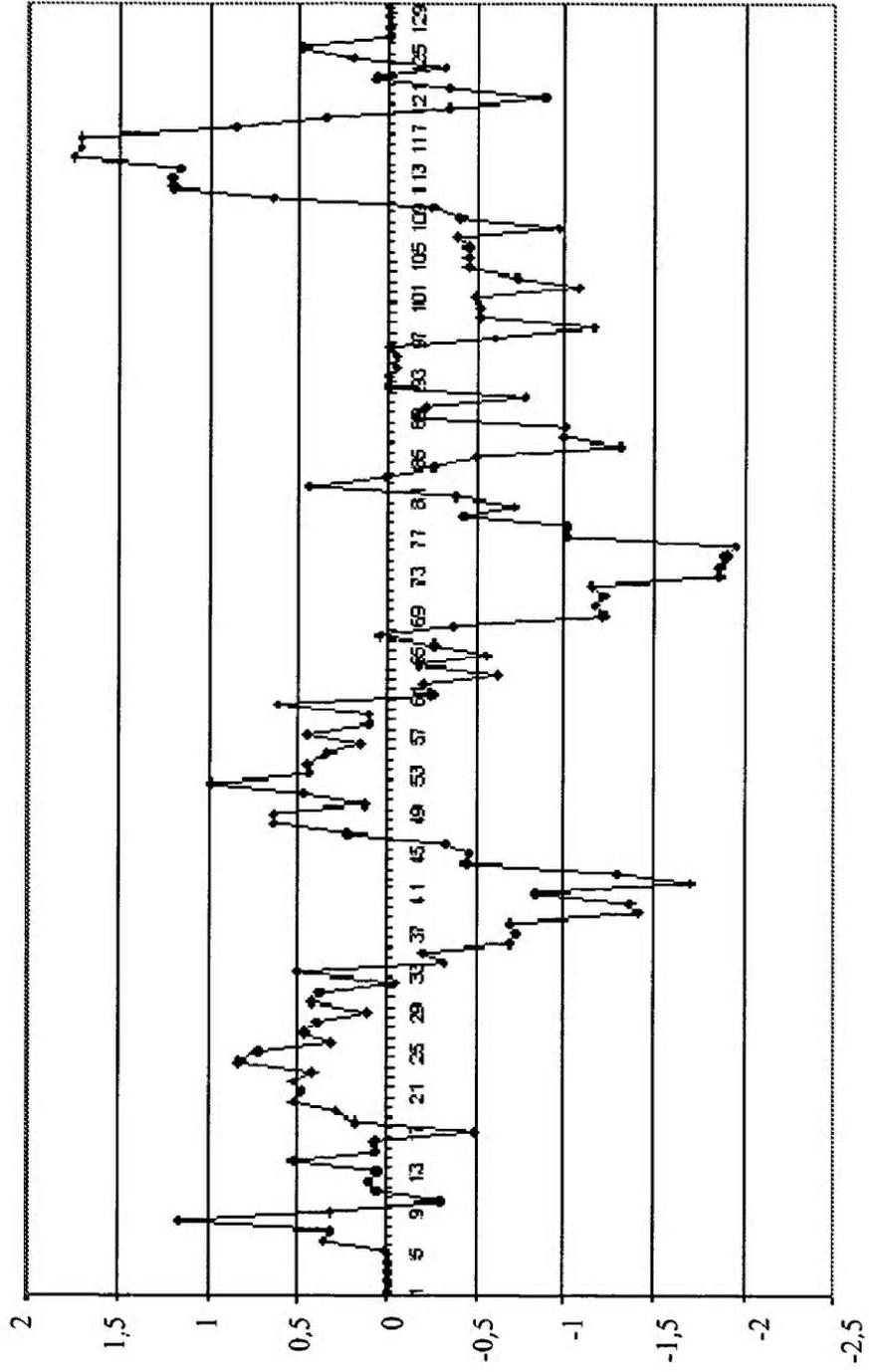


Fig. 4

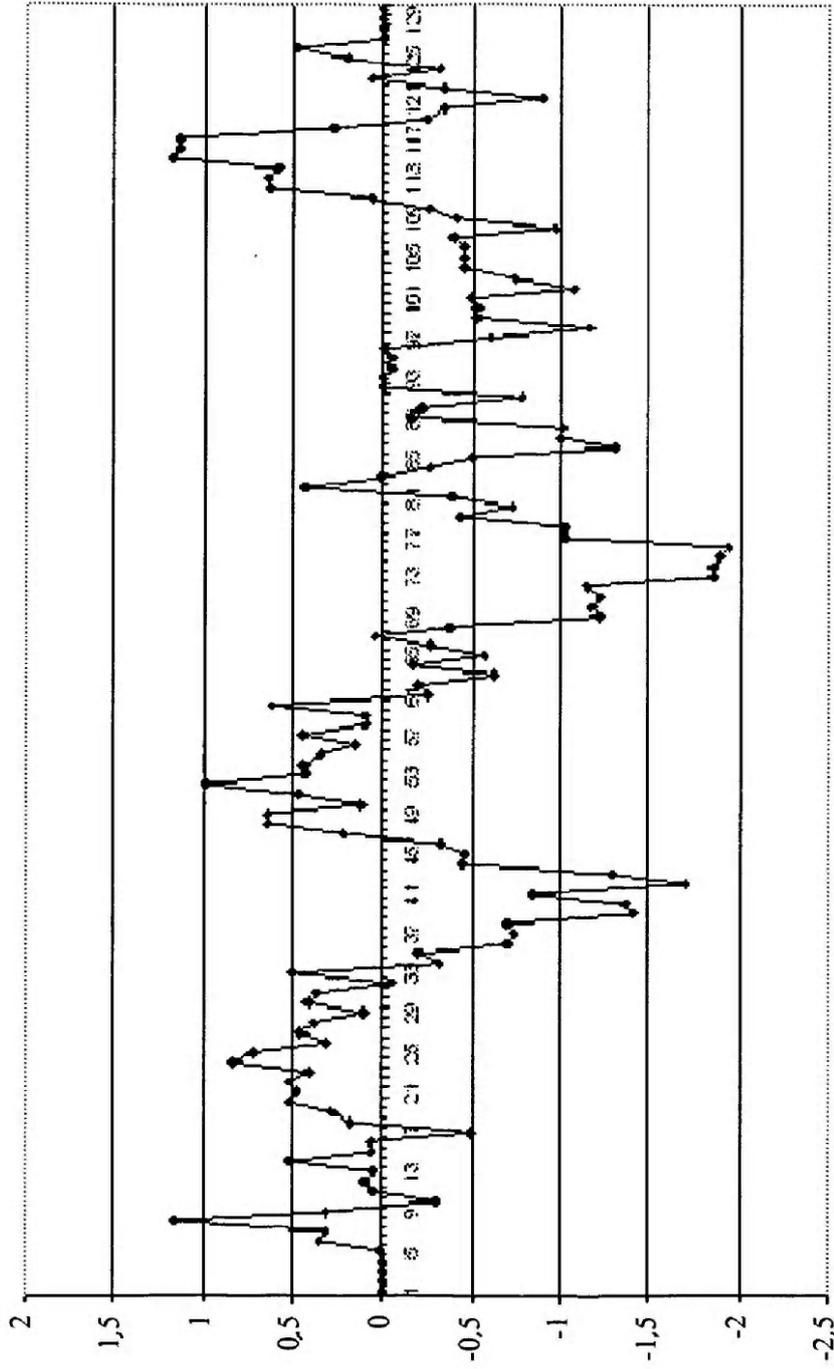


Fig. 5

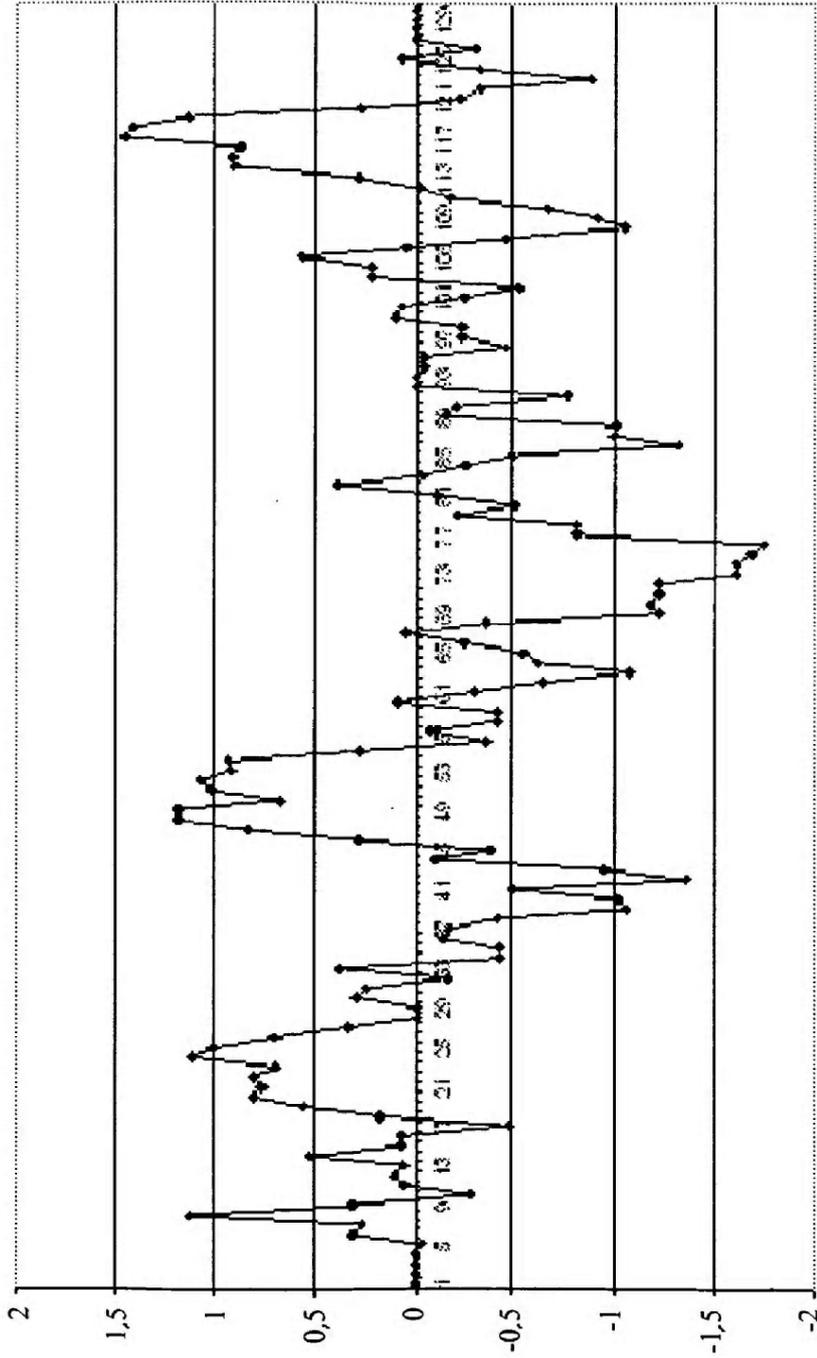


Fig. 6

