

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 345**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2009 PCT/CH2009/000221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09155725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009 E 09768694 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2307455**

54 Título: **Optimización de la solubilidad de agentes de unión inmunológica**

30 Prioridad:
25.06.2008 US 75692 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2017

73 Titular/es:
**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL
RESEARCH UNIT LLC (100.0%)
Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:
**BORRAS, LEONARDO y
URECH, DAVID**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 629 345 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

Optimización de la solubilidad de agentes de unión inmunológica

Antecedentes de la invención

5 Los anticuerpos han demostrado ser agentes terapéuticos muy eficaces y satisfactorios en el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos. Aunque normalmente se han usado clínicamente anticuerpos de longitud completa, existen varias ventajas que puede proporcionar el uso de un fragmento de anticuerpo, tal como aumento de la penetración en el tejido, ausencia de la función efectora de Fc combinada con la capacidad para añadir otras funciones efectoras y la probabilidad de menos efectos secundarios sistémicos que resultan de una semivida *in vivo* más corta de manera sistémica. Las propiedades farmacocinéticas de fragmentos de anticuerpo indican que pueden ser particularmente muy adecuados para enfoques terapéuticos locales. Además, los fragmentos de anticuerpo pueden ser más fáciles de producir que los anticuerpos de longitud completa en determinados sistemas de expresión.

15 Un tipo de fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), que se compone de un dominio variable de cadena pesada (V_H) conjugado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante una secuencia de ligador. Por tanto, los scFv carecen de todos los dominios de región constante de anticuerpo y los residuos de aminoácido de la anterior superficie de contacto de dominio variable/constante (residuos de superficie de contacto) quedan expuestos al disolvente. Puede prepararse un scFv a partir de un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, molécula de IgG) a través de técnicas de modificación mediante ingeniería genética recombinante establecidas. Sin embargo, la transformación de un anticuerpo de longitud completa para dar un scFv a menudo da como resultado estabilidad y solubilidad escasas de la proteína, bajos rendimientos de producción y una alta tendencia a agregarse, lo que aumenta el riesgo de inmunogenicidad.

25 Por consiguiente, se han realizado intentos para mejorar propiedades tales como solubilidad y estabilidad de los scFv. Por ejemplo, Nieba, L. *et al.* (Prot. Eng. (1997) 10:435-444) seleccionaron tres residuos de aminoácido que se sabía que eran residuos de superficie de contacto y los mutaron. Observaron un aumento de la expresión periplásmica de los scFv mutados en bacterias, así como una disminución de la tasa de agregación inducida térmicamente, aunque la estabilidad termodinámica y la solubilidad no se vieron alteradas significativamente. Además, en su publicación, declaran expresamente que no observaron ninguna mejora en la solubilidad del estado de la proteína nativa de los scFv modificados por ingeniería genética tal como se determinó mediante el método de precipitación de PEG. Davies y Riechmann (FEBS Letters (1994) 339: 285-290) describen fragmentos de anticuerpos humanos "camelizantes" sustituyendo residuos de aminoácido en la superficie de contacto de V_H/V_L . Jung *et al.* (J. Mol. Biol. (1999) 294: 163-180) describen el uso de una combinación de mutagénesis directa y aleatoria para generar una biblioteca de mutantes basada en el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) 4D5Flu. Las posiciones de aminoácido aleatorizadas en la biblioteca de presentación de fagos de 4D5Flu para la optimización del plegamiento y la estabilidad *in vivo* incluyen las posiciones de residuo 11, 89 y 108 (numeración de Kabat). También se han notificado otros estudios en los que se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio en residuos de aminoácido particulares dentro del scFv (véanse por ejemplo, Tan, P.H. *et al.* (1988) Biophys. J. 75:1473-1482; Wörn, A. y Plückthun, A. (1998) Biochem. 37:13120-13127; Wörn, A. y Plückthun, A. (1999) Biochem. 38:8739-8750). En estos diversos estudios, se eligieron los residuos de aminoácido seleccionados para la mutagénesis basándose en sus posiciones conocidas dentro de la estructura de scFv (por ejemplo, a partir de estudios de modelado molecular).

40 En otro enfoque, se injertaron las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un scFv muy escasamente expresado en las regiones de marco de un scFv que había demostrado tener propiedades favorables (Jung, S. y Plückthun, A. (1997) Prot. Eng. 10:959-966). El scFv resultante mostró una expresión soluble y estabilidad termodinámica mejoradas.

45 El progreso en la modificación mediante ingeniería genética de scFv para mejorar la solubilidad y otras propiedades funcionales se revisa, por ejemplo, en Wörn, A. y Plückthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 305:989-1010. Sin embargo, todavía son necesarios nuevos enfoques que permitan el diseño racional de agentes de unión inmunológica, en particular de scFv con solubilidad superior. Además, todavía son necesarios métodos de modificación mediante ingeniería genética de scFv, y otros tipos de anticuerpos, para conferir de ese modo solubilidad mejorada, especialmente solubilidad de la proteína nativa.

50 Sumario de la invención

Esta invención se refiere a un agente de unión inmunológica que comprende un motivo que potencia la solubilidad en la región variable de cadena pesada V_H así como a métodos para modificar mediante ingeniería genética agentes de unión inmunológica, tal como anticuerpos scFv, para conferir solubilidad mejorada. En realizaciones particulares, los métodos de la invención comprenden la sustitución de aminoácidos dentro de una secuencia de la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena ligera de un agente de unión inmunológica que son

potencialmente problemáticos para la solubilidad con residuos de aminoácido preferidos que confieren solubilidad mejorada. Por ejemplo, en determinadas realizaciones preferidas, un residuo hidrófobo se sustituye con un residuo hidrófilo.

5 Preferiblemente, el agente de unión inmunológica proporcionado, el agente de unión inmunológica usado en, o producido mediante, los métodos de modificación mediante ingeniería genética de la invención es un scFv, pero también pueden modificarse mediante ingeniería genética otros agentes de unión inmunológica, tales como inmunoglobulinas de longitud completa, fragmentos Fab, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, los Dab) y Nanobodies según el método. La invención también abarca agentes de unión inmunológica preparados según el método de modificación mediante ingeniería genética, así como composiciones que comprenden los agentes de
10 unión inmunológica y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención se define mediante las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención se refiere a un agente de unión inmunológica que comprende uno de los siguientes motivos que potencian la solubilidad en las posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 (numeración de AHo):

- 15 (a) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;
- (b) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y
- (c) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o
- (a1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;
- (b1) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y
- 20 (c1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o
- (a2) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;
- (b2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y
- (c2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o
- (a3) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;
- 25 (b3) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y
- (c3) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método un método de modificación mediante ingeniería genética de un agente de unión inmunológica, comprendiendo el agente de unión inmunológica (i) una región variable de cadena pesada, o fragmento de la misma, comprendiendo la región variable de cadena pesada residuos de región de marco de V_H y/o (ii) una región variable de cadena ligera, o fragmento de la misma, comprendiendo la región variable de
30 cadena ligera residuos de región de marco de V_L , comprendiendo el método:

A) seleccionar al menos dos posiciones de aminoácido dentro de los residuos de región de marco de V_H , los residuos de región de marco de V_L o los residuos de región de marco de V_H y de V_L para la mutación; y

B) mutar las al menos dos posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación,

35 en el que si las al menos dos posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación están dentro de los residuos de región de marco de V_H , la sustitución tiene lugar en una o más posiciones de aminoácido de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en 12, 103 y 144 (según el convenio de numeración de AHo) y/o

en el que si la una o más posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación están dentro de los residuos de región de marco de V_L , la sustitución tiene lugar en una posición de aminoácido de cadena ligera seleccionada del
40 grupo que consiste en 15, 52 y 147 (según el convenio de numeración de AHo; posiciones de aminoácido 15, 44 y 106 usando la numeración de Kabat).

Las al menos dos posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación, y el/los residuo(s) de aminoácido insertado en la(s) posición/posiciones seleccionada(s) se describen en más detalle a continuación. La numeración

de las posiciones de aminoácido expuesta a continuación usa el sistema de numeración de AHO; las posiciones correspondientes usando el sistema de numeración de Kabat se describen además en el presente documento y las tablas de conversión para los sistemas de numeración de AHO y de Kabat se exponen a continuación en la descripción detallada. Los residuos de aminoácido se exponen usando el código de abreviatura de una letra convencional.

Se ha encontrado sorprendentemente que la presencia de las mutaciones indicadas en las posiciones indicadas aumenta la solubilidad global del agente de unión inmunológica sin tener un impacto negativo en otras propiedades funcionales de la proteína. Por ejemplo, en el caso de la combinación de las tres mutaciones que potencian la solubilidad V12S, L144S y V103T en la V_H de un scFv, se encontró que dichas sustituciones representan aproximadamente el 60% de toda la solubilidad de scFv. Esto difiere de los intentos notificados en la técnica anterior para aumentar el rendimiento de expresión de agentes de unión inmunológica. Por ejemplo, el documento US 6.815.540 describe la modificación de un agente de unión inmunológica disminuyendo la hidrofobia en una región de la superficie de contacto entre dominios en la cadena. Para dicho fin, se identificaron 16 posiciones en la región de marco variable de cadena pesada que pueden sustituirse individualmente por uno o más aminoácidos seleccionados de un grupo de 10 aminoácidos. Se encontró que se aumentó el rendimiento de expresión de los mutantes generados. Además, el mismo grupo de investigación publicó en 1999, es decir, tres años antes de la fecha prioritaria de la patente estadounidense mencionada, un artículo (véase Jung, S., Honegger, A. y Plückthun, A. (1997) Prot. Eng. 10:959-966) declarando que el reemplazo de residuos de superficie hidrófoba por otros más hidrófilos se han notificado en varios estudios para mejorar el rendimiento de producción. Según los autores, el aumento en el rendimiento de producción se debe un reparto cinético mejorado entre el plegamiento correcto y la agregación de material mal plegado, mientras que la solubilidad de la proteína nativa no resulta siquiera afectada, ni su estabilidad termodinámica de manera significativa. Por tanto, le resulta claro a un experto en la técnica que el parámetro de solubilidad al que Plückthun *et al* se refieren, atañe solamente a la expresión soluble y no a la solubilidad global de la proteína nativa.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor y los objetivos distintos a los expuestos anteriormente resultarán evidentes cuando se dé consideración a la siguiente descripción detallada de los mismos. Tal descripción se refiere a los dibujos anexos, en los que:

La figura 1 representa las curvas de solubilidad de precipitación de PEG de ESBA105 silvestre (E105) y variantes de solubilidad del mismo.

La figura 2 representa los perfiles de desnaturalización térmica para ESBA105 silvestre (E105) y variantes de solubilidad del mismo tal como se miden tras exposición térmica en un amplio intervalo de temperaturas (25-96°C).

La figura 3 representa un gel de SDS-PAGE que muestra el comportamiento de degradación de diversos mutantes de solubilidad de ESBA105 después de dos semanas de incubación en condiciones de estrés térmico.

La figura 4 representa las curvas de desnaturalización térmica de EP43máx y sus variantes optimizadas tal como se determina mediante análisis de FTIR.

La figura 5 representa la estabilidad térmica de 578mín-máx y 578mín-máx_DHP tal como se mide mediante FT-IR.

Las figuras 6a y 6b ilustran la solubilidad de 578mín-máx y 578mín-máx_DHP tal como se determina mediante precipitación de sulfato de amonio.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a métodos para potenciar la solubilidad de agentes de unión inmunológica. Más específicamente, la presente invención da a conocer métodos para optimizar agentes de unión inmunológica introduciendo sustituciones de aminoácido dentro del agente de unión inmunológica que mejoran la solubilidad del agente de unión inmunológica. La invención también se refiere a agentes de unión inmunológica modificados mediante ingeniería genética, por ejemplo, scFv, producidos según los métodos de la invención.

Para que la invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen ciertos términos. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la invención, a continuación se describen materiales y métodos adecuados. En caso de conflicto, prevalece la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento es un sinónimo de “inmunoglobulina”. Los anticuerpos según la presente invención pueden ser inmunoglobulinas completas o fragmentos de las mismas, que comprenden al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, tal como dominios variables individuales, Fv (Skerra A. y Plückthun, A. (1988) *Science* 240:1038-41), scFv (Bird, R.E. *et al.* (1988) *Science* 242:423-26; Huston, J.S. *et al.* (1988; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83), Fab, (Fab')₂ u otros fragmentos que conoce bien un experto en la técnica.

El término “región de marco de anticuerpo” o “región de marco” tal como se usa en el presente documento se refiere a la parte del dominio variable, o bien VL o bien VH, que sirve como armazón para los bucles de unión a antígeno de este dominio variable (Kabat, E.A. *et al.*, (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. Publicación del NIH 91-3242).

El término “CDR de anticuerpo” o “CDR” tal como se usa en el presente documento se refiere a las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo que consisten en los bucles de unión a antígeno tal como se definieron por Kabat E.A. *et al.*, (1991) (*Sequences of proteins of immunological interest*. Publicación del NIH 91-3242). Cada uno de los dos dominios variables de un fragmento Fv de anticuerpo contiene, por ejemplo, tres CDR.

El término “anticuerpo de cadena sencilla” o “scFv” se refiere a una molécula que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo conectadas por un ligador. Tales moléculas de scFv pueden tener las estructuras generales: NH₂-V_L-ligador-V_H-COOH o NH₂-V_H-ligador-V_L-COOH.

Tal como se usa en el presente documento, “identidad” se refiere a la coincidencia de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad monomérica de aminoácido o base (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El “porcentaje de identidad” entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividido entre el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si coinciden 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias, entonces las dos secuencias tienen una identidad del 60%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten una identidad del 50% (coinciden 3 de las 6 posiciones totales). Generalmente, se realiza una comparación cuando se alinean dos secuencias para dar una máxima identidad. Tal alineación puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método de Needleman *et al.* (1970) *J Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado de manera conveniente mediante programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.).

Secuencias “similares” son aquéllas que, cuando se alinean, comparten residuos de aminoácido idénticos y similares, en los que residuos similares son sustituciones conservativas por residuos de aminoácido correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una “sustitución conservativa” de un residuo en una secuencia de referencia es una sustitución por un residuo que es física o funcionalmente similar al residuo de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por tanto, una secuencia “modificada con una sustitución conservativa” es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia silvestre en la que están presentes una o más sustituciones conservativas. El “porcentaje de similitud” entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen residuos coincidentes o sustituciones conservativas compartidas por las dos secuencias dividido entre el número de posiciones comparadas y multiplicadas por un factor 100. Por ejemplo, si coinciden 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservativas, entonces las dos secuencias tienen una similitud positiva del 80%.

“Secuencia consenso de aminoácidos” tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede generarse usando una matriz de al menos dos, y preferiblemente más, secuencias de aminoácidos alineadas, y permitiendo huecos en la alineación, de manera que es posible determinar el residuo de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que están representados más frecuentemente en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén igualmente representados en una única posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos de esos aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de una proteína puede analizarse a diversos niveles. Por ejemplo, puede presentarse conservación o variabilidad a nivel de un solo residuo, a nivel de múltiples residuos, múltiples residuos con huecos, etc. Los residuos pueden presentar conservación del residuo idéntico o pueden conservarse a nivel de clase. Los ejemplos de clases de aminoácido incluyen la clase de aminoácido con grupos R o cadenas laterales polares pero no cargados (serina, treonina, asparagina y glutamina); con grupos R cargados positivamente (lisina, arginina e histidina); con grupos R cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico); con grupos R hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina); y la clase de aminoácidos especiales (cisteína, glicina y prolina). Un experto en la técnica conoce otras clases y pueden definirse usando

determinaciones estructurales u otros datos para evaluar la capacidad de sustitución. En ese sentido, un aminoácido sustituible puede referirse a cualquier aminoácido que puede sustituirse y mantener la conservación funcional en esa posición.

5 Se reconocerá, sin embargo, que aminoácidos de la misma clase pueden variar en grado por sus propiedades biofísicas. Por ejemplo, se reconocerá que determinados grupos R hidrófobos (por ejemplo, alanina, serina o treonina) son más hidrófilos (es decir, de hidrofilia superior o hidrofobia inferior) que otros grupos R hidrófobos (por ejemplo, valina o leucina). La hidrofilia o hidrofobia relativas pueden determinarse usando métodos reconocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Rose *et al.*, Science, 229: 834-838 (1985) y Cornette *et al.*, J. Mol. Biol., 195: 659-685 (1987)).

10 Tal como se usa en el presente documento, cuando una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una primera secuencia de V_H o V_L) se alinea con una o más secuencias de aminoácidos adicionales (por ejemplo, una o más secuencias de V_H o V_L en una base de datos), puede compararse una posición de aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia de V_H o V_L) con una "posición correspondiente" en la una o más secuencias de aminoácidos adicionales. Tal como se usa en el presente documento, la "posición correspondiente" representa la posición equivalente en la(s) secuencia(s) que está(n) comparándose cuando las secuencias están óptimamente alineadas, es decir, cuando las secuencias están alineadas para lograr el mayor porcentaje de identidad o porcentaje de similitud.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "base de datos de anticuerpos" se refiere a una colección de dos o más secuencias de aminoácidos de anticuerpos (una "multiplicidad" de secuencias), y normalmente se refiere a una colección de decenas, cientos o incluso miles de secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Una base de datos de anticuerpos puede almacenar secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, una colección de regiones V_H de anticuerpo, regiones V_L de anticuerpo o ambas, o puede almacenar una colección de secuencias de scFv que se compone de regiones V_H y V_L . Preferiblemente, la base de datos se almacena en un medio fijo, en el que pueden realizarse búsquedas, tal como en un ordenador dentro de un programa informático en el que pueden realizarse búsquedas. La base de datos de anticuerpos puede ser una base de datos que comprende o que consiste en secuencias de anticuerpos de líneas germinales. Además, la base de datos de anticuerpos puede ser una base de datos que comprende o que consiste en secuencias de anticuerpos maduros (es decir, expresados) (por ejemplo, una base de datos Kabat de secuencias de anticuerpos maduros, por ejemplo, una base de datos KBD). Aún adicionalmente, la base de datos de anticuerpos puede comprender o consistir en secuencias seleccionadas funcionalmente (por ejemplo, secuencias seleccionadas a partir de un ensayo QC).

35 El término "agente de unión inmunológica" se refiere a una molécula que contiene la totalidad o una parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, la totalidad o parte del dominio variable de cadena pesada y/o ligera, de manera que el agente de unión inmunológica reconoce específicamente un antígeno diana. Los ejemplos no limitativos de agentes de unión inmunológica incluyen moléculas de inmunoglobulina de longitud completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (v) un fragmento Fv que comprende los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un anticuerpo de un solo dominio tal como un fragmento Dab (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H o V_L , un anticuerpo de camélido (véanse Hamers-Casterman, *et al.*, Nature 363:446-448 (1993) y Dumoulin, *et al.*, Protein Science 11:500-515 (2002)) o de tiburón (por ejemplo, Nanobodies® de Ig-NAR de tiburón; y (vii) un Nanobody, una región variable de cadena pesada que contiene un solo dominio variable y dos dominios constantes.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "propiedad funcional" es una propiedad de un polipéptido (por ejemplo, un agente de unión inmunológica) para el que se desea una mejora (por ejemplo, con relación a un polipéptido convencional) y/o resulta ventajoso para un experto en la técnica, por ejemplo, para mejorar las propiedades de fabricación o la eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es estabilidad (por ejemplo, estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es solubilidad (por ejemplo, en condiciones celulares). En aún otra realización, la propiedad funcional es el comportamiento de agregación. En todavía otra realización, la propiedad funcional es la expresión de proteínas (por ejemplo, en una célula procarionota). En aún otra realización, la propiedad funcional es el rendimiento de replegamiento tras la solubilización de cuerpos de inclusión en un correspondiente proceso de purificación. En determinadas realizaciones, la afinidad de unión a antígeno no es una propiedad funcional deseada para la mejora. En aún otra realización, la mejora de la propiedad funcional no implica un cambio sustancial en la afinidad de unión a antígeno.

El término "solubilidad" tal como se usa en el presente documento se refiere a la solubilidad de la proteína nativa, es decir del agente de unión inmunológica monomérico, sin agregar y funcional. "Solubilidad potenciada" significa una mejora de la solubilidad de la proteína nativa que se determina preferiblemente mediante al menos uno de los siguientes métodos: precipitación PEG, precipitación de sulfato de amonio, rendimiento de replegamiento o cualquier

otro método para determinar la solubilidad que lo conoce un experto en la técnica. El método de precipitación de PEG es un método en el sentido que se describe por Atha *et al.* en "Mechanism of Precipitation of Proteins by Polietilene Glycols", JBC, 256: 12108-12117 (1981). La precipitación de sulfato de amonio puede, por ejemplo, llevarse a cabo tal como sigue a continuación: se preparan alícuotas de 10 µl de disoluciones de proteína 20 mg/ml a cada una de las cuales se le añaden 10 µl de disolución de (NH₄)₂SO₄ de un grado de saturación distinto (por ejemplo, el 35%, el 33%, el 31%, el 29%, el 25%, el 20% y el 15%), seguido por agitación en vórtex durante 5 segundos y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 6000 rpm a 4°C durante 30 minutos, se determina la concentración de proteínas en el sobrenadante. En este método, el comparador para proteínas diferentes es el valor V50, que es el porcentaje de saturación de (NH₄)₂SO₄ al que el 50% de la proteína se precipita. El V50 se determina a partir de un gráfico de proteína soluble determinada en el sobrenadante frente al porcentaje aplicado de saturación de (NH₄)₂SO₄. El rendimiento de repliegamiento corresponde al porcentaje de proteína correctamente plegada obtenido de cuerpos de inclusión solubilizados en un correspondiente proceso de fabricación/purificación. El término solubilidad tal como se usa en el presente documento no se refiere a la expresión soluble.

15 Agentes de unión inmunológica con solubilidad mejorada

En un primer aspecto, se proporciona un agente de unión inmunológica que comprende uno de los siguientes motivos que potencian la solubilidad en las posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 (numeración de AHO):

(a) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

20 (b) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o

(a1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

(b1) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o

25 (a2) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

(b2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144.

Se ha encontrado sorprendentemente que la presencia de los aminoácidos indicados en las posiciones indicadas aumenta la solubilidad global de todo el agente de unión inmunológica. Por ejemplo, en el caso de la combinación de las tres mutaciones que potencian la solubilidad V12S, L144S y V103T en la V_H de un scFv, se encontró que dichas sustituciones representan aproximadamente el 60% de toda la solubilidad de scFv. Puesto que se conservan parches hidrófobos en los dominios variables de todos los agentes de unión inmunológica, pueden usarse una o más sustituciones en las posiciones indicadas para mejorar la solubilidad de cualquier agente de unión inmunológica.

35 El agente de unión inmunológica es preferiblemente un anticuerpo scFv, una inmunoglobulina de longitud completa, un fragmento Fab, un Dab o un Nanobody.

En una realización preferida, el agente de unión inmunológica comprende además uno o más aminoácidos del grupo que consiste en (a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31, (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83, (c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43, (d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67 y (e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78. La presencia de uno o más de los aminoácidos indicados en las correspondientes posiciones confiere al agente de unión inmunológica estabilidad potenciada.

40 Los aminoácidos indicados en el presente documento pueden estar presentes en el agente de unión inmunológica que se produce de manera natural o derivado del mismo, o el agente de unión inmunológica puede modificarse mediante ingeniería genética para incorporar uno o más de los aminoácidos mencionados anteriormente.

45 En una realización preferida, el agente de unión inmunológica dado a conocer en el presente documento se une específicamente a TNF α humano o a VEGF humano.

Modificación mediante ingeniería genética de agentes de unión inmunológica con solubilidad mejorada

Tal como se describe en detalle en los ejemplos, se ha usado con éxito un enfoque basado en secuencias descrito en el presente documento para identificar sustituciones de residuo de aminoácido particulares que confieren solubilidad mejorada. Los ejemplos indican sustituciones de aminoácido a modo de ejemplo y preferidas en las posiciones definidas de aminoácido dentro de las regiones de V_H y opcionalmente en la región de V_L de un agente de unión inmunológica (por ejemplo, un scFv). Las sustituciones a modo de ejemplo incluyen sustitución de residuos de aminoácido problemáticos (por ejemplo, residuos hidrófobos, expuestos a disolvente) en las posiciones de aminoácido que son más hidrófilas y que se producen con mayor frecuencia en la base de datos (por ejemplo, una base de datos de anticuerpos maduros (KDB)). Una sustitución particularmente preferida es el residuo que se produce con la mayor frecuencia que es más hidrófilo que el residuo problemático. En otras realizaciones, el aminoácido más hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), y treonina (T).

Por consiguiente, la invención se refiere a métodos de modificación mediante ingeniería genética en los que una o más sustituciones de aminoácido especificadas se introducen en un agente de unión inmunológica, tal como un anticuerpo scFv. Tales sustituciones pueden llevarse a cabo usando métodos de biología molecular convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis mediada por PCR y similares.

Tal como se expone en los ejemplos, se han identificado las siguientes posiciones de aminoácido como aminoácidos problemáticos (es decir, denominados "parches hidrófobos") para la modificación en las secuencias V_H o V_L indicadas:

V_H: posiciones de aminoácido 2, 4, 5, 12, 103 y 144; y

V_L: posiciones de aminoácido 15, 52 y 147.

La numeración usada es el sistema de numeración de AHO; las tablas de conversión para convertir la numeración de AHO a la numeración del sistema de Kabat se exponen como las tablas 1 y 2.

Se ha encontrado sorprendentemente que sustituciones en dos o más de las posiciones de V_H 12, 103, 144 (según el sistema de numeración de AHO) afectan a la solubilidad global de todo el agente de unión inmunológica. Puesto que se conservan parches hidrófobos en los dominios variables de todos los agentes de unión inmunológica, pueden usarse al menos dos sustituciones en las posiciones indicadas para mejorar la solubilidad de cualquier agente de unión inmunológica.

La invención se refiere a un método para modificar mediante ingeniería genética un agente de unión inmunológica, tal como un anticuerpo scFv, en el que al menos se realizan dos sustituciones de aminoácido en una o más posiciones de aminoácido identificadas anteriormente para producir así formas variantes (es decir, mutadas) de los agentes de unión inmunológica.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un método para modificar mediante ingeniería genética un agente de unión inmunológica, comprendiendo el método:

A) seleccionar al menos tres posiciones de aminoácido dentro de la región de V_H, la región de V_L o las regiones de V_H y V_L para la mutación; y

B) mutar las al menos tres posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación,

en el que las al menos tres posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación están dentro de la región de V_H, y la sustitución se encuentra en las al menos tres posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 (según el convenio de numeración de AHO; posiciones de aminoácido 11, 89 y 108 usando la numeración de Kabat). Si una o más posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación están dentro de la región de V_L, la sustitución tiene lugar en una posición de aminoácido de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en 15, 52 y 147 (según el convenio de numeración de AHO; posiciones de aminoácido 15, 44 y 106 usando la numeración de Kabat).

En determinadas realizaciones, la posición de aminoácido está ocupada por un aminoácido hidrófobo (por ejemplo, leucina (L) o valina (V)). En una realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 12 es valina (V). En otra realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 103 es valina (V). En otra realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 144 es leucina (L). En otra realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena ligera 15 es valina (V). En otra realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena ligera 52 es fenilalanina (F). En otra realización, el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena ligera 147 es valina (V).

Preferiblemente, la mutación es una sustitución del aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada con un aminoácido más hidrófilo. En otras realizaciones, el aminoácido más hidrófilo se selecciona de serina (S) o treonina (T).

5 En determinadas realizaciones, el método comprende: a) seleccionar al menos dos posiciones de aminoácido dentro del agente de unión inmunológica para la mutación; y b) mutar las al menos dos posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación, en el que la mutación comprende al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

(i) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12 usando la numeración de AHo (posición 11 usando la numeración de Kabat);

10 (ii) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103 usando la numeración de AHo (posición 89 usando la numeración de Kabat); y

(iii) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144 usando la numeración de AHo (posición 108 usando la numeración de Kabat).

15 En una realización mucho más preferida, al menos una de las posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 es treonina (T).

En aún otras realizaciones, la mutación comprende sustitución con treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena ligera 15 usando la numeración de AHo o de Kabat y/o sustitución con alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena ligera 147 usando la numeración de AHo (posición 106 usando la numeración de Kabat convención).

20 En otras realizaciones, la mutación da como resultado al menos un aumento de 2 veces en la solubilidad (por ejemplo, un aumento de 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces o superior en la solubilidad).

En otra realización, la estabilidad térmica, el replegamiento, el rendimiento de expresión, la agregación y/o la actividad de unión del agente de unión inmunológica no resultan afectados adversamente por la mutación.

25 En determinadas realizaciones, la mutación comprende además una o más mutaciones estabilizantes en una posición de aminoácido (convenio de numeración de AHo) seleccionada del grupo que consiste en: (a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31; (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83; (c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43; (d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67; y (e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78. Estas mutaciones han demostrado tener un efecto sobre la estabilidad del agente de unión inmunológica.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un agente de unión inmunológica preparado según el método de la invención.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, un agente de unión inmunológica modificado mediante ingeniería genética según el método de la invención es un agente de unión inmunológica reconocido en la técnica que se une a un antígeno diana de importancia terapéutica o un agente de unión inmunológica que comprende regiones variables (regiones VL y/o VL) o una o más CDR (por ejemplo, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3) derivadas del agente de unión inmunológica de importancia terapéutica. Por ejemplo, agentes de unión inmunológica aprobados actualmente por la FDA u otras autoridades reguladoras pueden modificarse mediante ingeniería genética según los métodos de la invención. Más específicamente, estos agentes de unión inmunológica a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD3 tales como muromonab (Orthoclone® OKT3; Johnson&Johnson, Brunswick, NJ; véase Arakawa *et al.* J. Biochem, (1996) 120:657-662; Kung y Goldstein *et al.*, Science (1979), 206: 347- 349), anticuerpos anti-CD 11 tales como efalizumab (Raptiva®, Genentech, South San Francisco, CA), anticuerpos anti-CD20 tales como rituximab (Rituxan®/Mabthera®, Genentech, South San Francisco, CA), tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline, Londres) o ibritumomab (Zevalin®, Biogen Idec, Cambridge MA) (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.736.137; 6.455.043; y 6.682.734), anticuerpos anti-CD25 (IL2R α) tales como daclizumab (Zenapax®, Roche, Basilea, Suiza) o basiliximab (Simulect®, Novartis, Basilea, Suiza), anticuerpos anti-CD33 tales como gemtuzumab (Mylotarg®, Wyeth, Madison, NJ, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.714.350 y 6.350.861), anticuerpos anti-CD52 tales como alemtuzumab (Campath®, Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA), anticuerpos anti-GpIIb/gIIa tales como abciximab (ReoPro®, Centocor, Horsham, PA), anticuerpos anti-TNF α tales como infliximab (Remicade®, Centocor, Horsham, PA) o adalimumab (Humira®, Abbott, Abbott Park, IL, véase la patente estadounidense n.º 6.258.562), anticuerpos anti-IgE tales como omalizumab (Xolair®, Genentech, South San Francisco, CA), anticuerpos anti-VSR tales como palivizumab (Synagis®, Medimmune, Gaithersburg, M, véase la patente estadounidense n.º 5.824.307),

anticuerpos anti-EpCAM tales como edrecolomab (Panorex®, Centocor), anticuerpos anti-EGFR tales como cetuximab (Erbix®, Imclone Systems, Nueva York, NY) o panitumumab (Vectibix®, Amgen, Thousand Oaks, CA), anticuerpos anti-HER2/neu tales como trastuzumab (Herceptin®, Genentech), anticuerpos anti-integrina $\alpha 4$ tales como natalizumab (Tysabri®, BiogenIdec), anticuerpos anti-C5 tales como eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT) y anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab (Avastin®, Genentech, véase la patente estadounidense n.º 6.884.879) o ranibizumab (Lucentis®, Genentech).

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, un agente de unión inmunológica modificado mediante ingeniería genética según el método de la invención es un agente de unión inmunológica reconocido en la técnica descrito anteriormente. En una realización preferida, el agente de unión inmunológica es un anticuerpo scFv. En otras realizaciones, el agente de unión inmunológica es, por ejemplo, una inmunoglobulina de longitud completa, Dab, Nanobody o un fragmento Fab.

A pesar de lo anterior, en diversas realizaciones, se excluyen determinados agentes de unión inmunológica de ser usados en los métodos de modificación mediante ingeniería genética de la invención y/o se excluyen de ser la composición de agente de unión inmunológica producida por los métodos de modificación mediante ingeniería genética. Por ejemplo, en diversas realizaciones, existe la condición de que el agente de unión inmunológica no sea ninguno de los anticuerpos scFv, o variantes de los mismos, tal como se da a conocer en las publicaciones PCT WO 2006/131013 y WO 2008/006235, tal como ESBA105 o variantes del mismo que se dan a conocer en las publicaciones PCT WO 2006/131013 y WO 2008/006235.

Preferiblemente, el agente de unión inmunológica dado a conocer en el presente documento, usado para el método dado a conocer en el presente documento o generado por el método dado a conocer en el presente documento, respectivamente, es un anticuerpo scFv, pero también se abarcan otros agentes de unión inmunológica, tal como inmunoglobulinas de longitud completa, fragmentos Fab o cualquier otro tipo de agente de unión inmunológica descrito en el presente documento (por ejemplo, los Dab o Nanobodies).

En una realización preferida, el agente de unión inmunológica tal como se da a conocer en el presente documento, usado para el método dado a conocer en el presente documento o generado por el método dado a conocer en el presente documento, respectivamente, se une específicamente a TNF α humano o a VEGF humano.

La invención abarca además composiciones que comprenden los agentes de unión inmunológica dados a conocer en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

Composiciones y formulaciones de scFv

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición de scFv preparada según los métodos de la invención. Por tanto, la invención proporciona composiciones de scFv modificado mediante ingeniería genética en las que se han introducido una o más mutaciones que potencian la solubilidad, en comparación con un scFv original de interés, en las que la(s) mutación/mutaciones se ha(n) introducido en la posición de un residuo de aminoácido hidrófobo. En una realización, el scFv se ha modificado mediante ingeniería genética para que contenga una posición de aminoácido mutada (por ejemplo, una posición de región de marco). En otras realizaciones, el scFv se ha modificado mediante ingeniería genética para que contenga dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez posiciones de aminoácido mutadas (por ejemplo, posiciones de región de marco).

En determinadas realizaciones, la mutación comprende además una o más mutaciones estabilizantes descritas en la solicitud de PCT n.º PCT/CH2008/000285, titulada "Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties", presentada el 25 de junio de 2008 o la solicitud estadounidense provisional con n.º de serie n.º 61/069,056, titulada "Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties", presentada el 12 de marzo 2008. Por ejemplo, el agente de unión inmunológica puede comprender además una sustitución en una posición de aminoácido (convenio de numeración de AHO) seleccionada del grupo que consiste en: (a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31; (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83; (c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43; (d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67; y (e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78. Una o más mutaciones en las posiciones indicadas tienen un efecto sobre la estabilidad global de todo el agente de unión inmunológica. En otras realizaciones, la mutación comprende además las siguientes mutaciones estabilizantes (convenio de numeración de AHO): (a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31; (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83; (c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43; (d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67; y (e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78.

Otro aspecto de la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de las composiciones de scFv de la invención. Tales formulaciones comprenden normalmente la composición de scFv y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los

disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal, epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión) o tópica (por ejemplo, al ojo o a la piel). Según la vía de administración, el scFv puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserve la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Puede garantizarse que se impide la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, citados anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica se conoce el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por microfiltración. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y secado por

congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada previamente por filtración de los mismos.

5 La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual dependerá del sujeto que esté tratándose, y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, con respecto al cien por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 0,01 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente el 1 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Se ajustan regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse de manera proporcional la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades diferenciadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que ha de lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la combinación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Sistemas de numeración de la posición del anticuerpo

25 Se proporcionan tablas de conversión para dos sistemas de numeración diferentes usados para identificar posiciones de residuo de aminoácido en regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo. El sistema de numeración de Kabat se describe adicionalmente en Kabat *et al.* (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., n.º de publicación de NIH 91-3242). El sistema de numeración de AHO se describe adicionalmente en Honegger, A. y Plückthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670).

30 Numeración de región variable de cadena pesada

Tabla 1: Tabla de conversión para las posiciones de residuo en el dominio variable de cadena pesada

Kabat	AHO	Kabat	AHO	Kabat	AHO
1	1	44	51	87	101
2	2	45	52	88	102
3	3	46	53	89	103
4	4	47	54	90	104
5	5	48	55	91	105
6	6	49	56	92	106
7	7	50	57	93	107
*	8	51	58	94	108
8	9	52	59	95	109
9	10	52a	60	96	110
10	11	52b	61	97	111

ES 2 629 345 T3

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
11	12	52c	62	98	112
12	13	*	63	99	113
13	14	53	64	100	114
14	15	54	65	100a	115
15	16	55	66	100b	116
16	17	56	67	100c	117
17	18	57	68	100d	118
18	19	58	69	100e	119
19	20	59	70	100f	120
20	21	60	71	100g	121
21	22	61	72	100h	122
22	23	62	73	100i	123
23	24	63	74	*	124
24	25	64	75	*	125
25	26	65	76	*	126
26	27	66	77	*	127
*	28	67	78	*	128
27	29	68	79	*	129
28	30	69	80	*	130
29	31	70	81	*	131
30	32	71	82	*	132
31	33	72	83	*	133
32	34	73	84	*	134
33	35	74	85	*	135
34	36	75	86	*	136
35	37	76	87	101	137
35a	38	77	88	102	138
35b	39	78	89	103	139
*	40	79	90	104	140

ES 2 629 345 T3

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
*	41	80	91	105	141
*	42	81	92	106	142
36	43	82	93	107	143
37	44	82a	94	108	144
38	45	82b	95	109	145
39	46	82b	96	110	146
40	47	83	97	111	147
41	48	84	98	112	148
42	49	85	99	113	149
43	50	86	100		

Columna 1, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 2, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 1. Columna 3, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 4, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 3. Columna 5, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 6, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 5

Numeración de región variable de cadena ligera

Tabla 2: Tabla de conversión para las posiciones de residuo en el dominio variable de cadena ligera Kabat

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	43	51	83	101
2	2	44	52	84	102
3	3	45	53	85	103
4	4	46	54	86	104
5	5	47	55	87	105
6	6	48	56	88	106
7	7	49	57	89	107
8	8	50	58	90	108
9	9	*	59	91	109
10	10	*	60	92	110
11	11	*	61	93	111
12	12	*	62	94	112

ES 2 629 345 T3

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
13	13	*	63	95	113
14	14	*	64	95a	114
15	15	*	65	95b	115
16	16	*	66	95c	116
17	17	51	67	95d	117
18	18	52	68	95e	118
19	19	53	69	95f	119
20	20	54	70	*	120
21	21	55	71	*	121
22	22	56	72	*	122
23	23	57	73	*	123
24	24	58	74	*	124
25	25	59	75	*	125
26	26	60	76	*	126
27	27	61	77	*	127
*	28	62	78	*	128
27a	29	63	79	*	129
27b	30	64	80	*	130
27c	31	65	81	*	131
27d	32	66	82	*	132
27e	33	67	83	*	133
27f	34	68	84	*	134
*	35	*	85	*	135
28	36	*	86	*	136
29	37	69	87	96	137
30	38	70	88	97	138
31	39	71	89	98	139
32	40	72	90	99	140
33	41	73	91	100	141

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
34	42	74	92	101	142
35	43	75	93	102	143
36	44	76	94	103	144
37	45	77	95	104	145
38	46	78	96	105	146
39	47	79	97	106	147
40	48	80	98	107	148
41	49	81	99	108	149
42	50	82	100		

Columna 1, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 2, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 1. Columna 3, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 4, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 3. Columna 5, posición de residuo en el sistema de numeración de Kabat. Columna 6, número correspondiente en el sistema de numeración de AHo para la posición indicada en la columna 5

Otras realizaciones

Se entiende que la divulgación también incluye cualquiera de las metodologías, referencias y/o composiciones expuestas en los apéndices (A-C) de la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 60/905.365 (solicitud que da prioridad del documento WO 08/110348) y los apéndices (A-I) de la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 60/937,112 (solicitud que da prioridad del documento WO09/000098), incluyendo, pero sin limitarse a, bases de datos identificadas, bioinformática, métodos de manipulación e interpretación de datos *in silico*, ensayos funcionales, secuencias preferidas, posiciones/alteraciones de residuo(s) preferidas, identificación y selección de región de marco, alteraciones de región de marco, alineación e integración de CDR y alteraciones/mutaciones preferidas.

Puede hallarse información adicional referente a estas metodologías y composiciones en los documentos U.S.S.N. 60/819.378; y 60/899.907, y la publicación PCT WO2008/006235, titulada "scFv Antibodies Which Pass Epithelial And/Or Endothelial Layers" presentada en julio de 2006 y el 6 de febrero de 2007 respectivamente; el documento WO06131013A2 titulado "Stable And Soluble Antibodies Inhibiting TNF α " presentado el 6 de junio de 2006; el documento EP1506236A2 titulado "Immunoglobulin Frameworks Which Demonstrate Enhanced Stability In The Intracellular Environment And Methods of Identifying Same" presentado el 21 de mayo de 2003; el documento EP1479694A2 titulado "Intrabodies ScFv with defined framework that is stable in a reducing environment" presentado el 18 de diciembre de 2000; el documento EP1242457B1 titulado "Intrabodies With Defined Framework That Is Stable In A Reducing Environment And Applications Thereof" presentado el 18 de diciembre de 2000; el documento WO03097697A2 titulado "Immunoglobulin Frameworks Which Demonstrate Enhanced Stability In The Intracellular Environment And Methods of Identifying Same" presentado el 21 de mayo de 2003; y el documento WO0148017A1 titulado "Intrabodies With Defined Framework That Is Stable In A Reducing Environment And Applications Thereof" presentado el 18 de diciembre de 2000; y Honegger *et al.*, J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001).

Además, se entiende que la divulgación también incluye metodologías y composiciones adecuadas para el descubrimiento y/o la mejora de otros formatos de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos de los mismos, por ejemplo Fab, Dab, y similares. Por consiguiente, los principios y residuos identificados en el presente documento como adecuados para la selección o alteración para lograr propiedades biofísicas y/o terapéuticas deseadas que pueden aplicarse a una amplia gama de agentes de unión inmunológica. En una realización, anticuerpos terapéuticamente relevantes, por ejemplo, anticuerpos aprobados por la FDA, se mejoran mediante la modificación de una o más posiciones de residuo tal como se da a conocer en el presente documento.

- 5 Sin embargo, la invención no se limita a la modificación mediante ingeniería genética de agentes de unión inmunológica. Por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que los métodos de la invención pueden aplicarse a la modificación mediante ingeniería genética de otras moléculas de unión, distintas de inmunoglobulina, incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas de unión a fibronectina tales como adnectinas (véase el documento WO01/64942 y las patentes estadounidenses n.ºs 6.673.901, 6.703.199, 7.078.490 y 7.119.171), Affibodies (véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses 6.740.734 y 6.602.977 y en el documento WO00/63243), anticalinas (también conocidas como lipocalinas) (véanse los documentos WO99/16873 y WO05/019254), proteínas de dominio A (véanse los documentos WO02/088171 y WO04/044011) y proteínas con repeticiones de anquirina tales como darpinas o proteínas con repeticiones de leucina (véanse los documentos WO02/20565 y WO06/083275).
- 10 La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como limitativos adicionalmente.

EJEMPLO 1: Generación de scFv con solubilidad mejorada

En este ejemplo se usó un enfoque basado en modelado estructural y análisis de secuencia para identificar mutaciones en regiones de marco de scFv que dan como resultado solubilidad mejorada.

15 a) Análisis estructural

- 20 Se modeló la estructura 3D del scFv ESBA105 usando el servidor automatizado de modelado de homología estructural de proteínas, accesible mediante el servidor web ExpASY. Se analizó la estructura según la superficie relativa accesible al disolvente (rSAS) y se clasificaron los residuos tal como sigue: (1) expuestos para residuos que muestran una rSAS $\geq 50\%$; y (2) parcialmente expuestos para residuos con $50\% \leq rSAS < 25\%$. Los residuos hidrófobos con una rSAS $\geq 25\%$ se consideraron parches hidrófobos. Para validar el área accesible al disolvente de cada parche hidrófobo encontrado, se realizaron cálculos a partir de 27 archivos de PDB con alta homología con ESBA105 y una resolución mayor de 2,7 Å. Se calcularon la rSAS promedio y la desviación estándar para los parches hidrófobos y se examinaron en detalle para cada uno de ellos (véase la tabla 3).

Tabla 3: Evaluación de los parches hidrófobos.

Residuo	Dominio	% de superficie expuesta al disolvente	% de STDE	rSAS	Variabilidad de secuencia	Superficie de contacto VH/antígeno	Superficie de contacto VH/VL	Superficie de contacto VH/CH
2	VH	23,06	19,26	10-25%	10-25%	> 0-20%	> 0-20%	0
4	VH	0,66	1,26	0-10%	0-10%	0		0
5	VH	61,85	12,96	50-75%	10-25%	0	> 0-20%	0
12	VH	70,27	9,17	50-75%	10-25%	0	0	60-80%
103	VH	35,85	5,85	25-50%	10-25%	0	> 0-2%	> 0-2%
144	VH	62,17	7,82	50-75%	10-25%	0	0	> 0-2%
15	VL	49,59	9,77	25-50%	10-25%	0	0	0
147	VL	31,19	23,32	25-50%	10-25%	0	0	60-80%

Residuo	Dominio	% de superficie expuesta al disolvente	% de STDE	rSAS	Variabilidad de secuencia	Superficie de contacto VH/antígeno	Superficie de contacto VH/VL	Superficie de contacto VH/CH
Columna 1: posición de residuo en el sistema de numeración de AHo. Columna 2, dominio para la posición indicada en la columna 1. Columna 3, cálculos de área accesible al disolvente promedio a partir de 27 archivos de PDB. Columna 4, desviaciones estándar de la columna 3. Columnas 5 a 9, papel estructural de los parches hidrófobos recuperados de AHo.								

5 La mayor parte de los parches hidrófobos identificados en ESBA105 correspondían a la superficie de contacto dominio variable-constante (VH/CH). Esto se correlacionó con hallazgos previos de residuos hidrófobos expuestos al disolvente en un formato de scFv (Nieba *et al.*, 1997). Dos de los parches hidrófobos (VH 2 y VH 5) también contribuían a la interacción VL-VH y, por tanto, se excluyeron del análisis posterior.

b) Diseño de mutaciones de solubilidad

10 Se recuperaron un total de 122 secuencias de VL y 137 de VH de la página web sobre anticuerpos de Annemarie Honegger (www.bioc.uzh.ch/antibody). Las secuencias correspondían originariamente a 393 estructuras de anticuerpo en formato de Fv o Fab extraídas del Banco de Datos de Proteínas (PDB) (www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Se usaron las secuencias para el análisis independientemente de la especie o el subgrupo para aumentar la probabilidad de encontrar aminoácidos alternativos con mayor hidrofiliidad que el residuo nativo. Se excluyeron las secuencias que tenían más del 95% de identidad con cualquier otra secuencia dentro de la base de datos para reducir el sesgo. Se alinearon las secuencias y se analizaron para determinar la frecuencia de residuos. Se aplicaron algoritmos y herramientas de análisis de secuencia para identificar y seleccionar mutaciones hidrófilas para perturbar los parches hidrófobos en ESBA105. Se alinearon las secuencias siguiendo el sistema de numeración de AHo para dominio variable de inmunoglobulina (Honegger y Plückthun 2001). Se restringió el análisis a las regiones de marco.

20 Se calculó la frecuencia de residuos, $f(r)$, para cada posición, i , en la base de datos personalizada mediante el número de veces que se observa un residuo particular dentro del conjunto de datos dividido entre el número total de secuencias. En una primera etapa, se calculó la frecuencia de aparición de los diferentes aminoácidos para cada parche hidrófobo. Se analizó la frecuencia de residuos para cada parche hidrófobo identificado en ESBA105 a partir de la base de datos personalizada descrita anteriormente. La tabla 4 notifica la frecuencia de residuos en los parches hidrófobos dividida entre la totalidad de los residuos presentes en la base de datos.

25 Tabla 4. Frecuencia de residuos de 259 secuencias de anticuerpos maduros en un formato de scFv o Fab para los parches hidrófobos identificados en ESBA105

Residuo	frecuencia relativa en VH				frecuencia relativa en VL	
	VH 4	VH 12	VH 103	VH 144	VL 15	VL 147
A	0,23046215	0	0	0	3,8647343	0,176821923
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0
F	0,483091787	0	0,483091787	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0

ES 2 629 345 T3

Residuo	frecuencia relativa en VH				frecuencia relativa en VL	
	VH 4	VH 12	VH 103	VH 144	VL 15	VL 147
I	0	2,415458937	9,661835749	0	5,314009662	70,38834951
K	0	0	0	0	0	0
L	96,61835749	89,85507246	7,246376812	27,0531401	45,89371981	15,53398058
M	0	0	10,62801932	1,93236715	0	0,970873786
N	0	0	0	0	0	0
P	0,966183575	0	0	0,966183575	21,73913043	0,485436893
Q	0	0	0	0,483091787	0	0
R	0	0	7,246376812	0	0	0
S	0	0,966183575	0	18,84057971	0	0
T	0	0	15,4589372	50,72463768	0,966183575	0
V	1,93236715	6,763285024	49,27536232	0	22,22222222	12,62135922
W	0	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0	0

5 En la segunda etapa, se usó la frecuencia de residuos hidrófilos en los parches hidrófobos para diseñar las mutaciones de solubilidad mediante la selección del residuo hidrófilo más abundante en cada parche hidrófobo. La tabla 5 notifica los mutantes de solubilidad identificados usando este enfoque. Se calculó la hidrofobicidad de los residuos parentales y mutantes como hidrofobicidad promedio de valores publicados en varios artículos y expresados en función del nivel de exposición de la cadena lateral al disolvente.

Tabla 5. Diferentes mutaciones de solubilidad introducidas en ESBA105 para perturbar los parches hidrófobos

Residuo	Dominio	% de superficie expuesta al disolvente	Residuo parental	Hidrofobicidad del residuo parental	Mutación de solubilidad	Hidrofobicidad de mutaciones
4	VH	0,66	L	85,2	A	42,7
12	VH	70,27	V	73,2	S	28
103	VH	35,85	V	73,2	T	32,8
144*	VH	62,17	V	73,2	S	28
15	VL	49,59	V	73,2	T	32,8
147	VL	31,19	L	85,2	A	42,7

Residuo	Dominio	% de superficie expuesta al disolvente	Residuo parental	Hidrofobicidad del residuo parental	Mutación de solubilidad	Hidrofobicidad de mutaciones
*El parche hidrófobo en la posición 144 se intercambi6 no por el residuo hidrófilo m6s abundante en la base de datos sino por Ser puesto que esta ya estaba contenida en el donador de CDR de ESBA105.						
Columna 1, posici6n de residuo en el sistema de numeraci6n de AHo. Columna 2, dominio para la posici6n indicada en la columna 1. Columna 3, c6lculos de 6rea accesible al disolvente promedio a partir de 27 archivos de PDB. Columna 4, residuos parentales en ESBA105. Columna 5, hidrofobicidades promedio de la columna 4, recuperadas de AHo. Columnas 6, residuo hidrófilo m6s abundante en la posici6n indicada en la columna 1. Hidrofobicidad promedio de la columna 6 recuperada de AHo.						

c) Pruebas de variantes de ESBA105 de solubilidad

5 Se introdujeron las mutaciones de solubilidad solas o en m6ltiples combinaciones y se sometieron a prueba para determinar los patrones de rendimiento de replegamiento, expresi6n, actividad y estabilidad y agregaci6n. La tabla 6 muestra las diversas combinaciones de mutaciones de solubilidad introducidas en cada variante optimizada de ESBA105 bas6ndose en la posible contribuci6n a la solubilidad y el nivel de riesgo de que la mutaci6n altere la uni6n a 6ntígeno.

Tabla 6: Dise6n de variantes de solubilidad para ESBA105.

Residuo de superficie hidrófobo	Dominio	Residuo parental	Mutantes**			
			Opt 1_0	Opt 0_2	Opt 1_2	Opt 2_4
15	VL	V	X		X	X
147*	VL	V				X
4*	VH	L				X
12	VH	V		X	X	X
103*	VH	V				V
144	VH	L		X	X	X
*Sometido a prueba por separado en una segunda tanda						
**El gui6n bajo separa el n6mero de mutaciones contenidas en la cadena ligera y en la pesada, respectivamente.						
Columna 1, posici6n de residuo en el sistema de numeraci6n de AHo. Columna 2, dominio para la posici6n indicada en la columna 1. Columna 3, residuo parental en ESBA105 en los diferentes parches hidrófobos. Columna 4, diferentes variantes que contienen mutaciones de solubilidad en las posiciones indicadas						

10

d) Mediciones de solubilidad

15 Se determinaron las solubilidades m6ximas de ESBA105 y variantes mediante el m6todo de precipitaci6n de PEG tal como se describi6 adicionalmente por Atha *et al.* (JBC, 256: 12108-12117 (1981)). En este m6todo, la concentraci6n de prote6nas en los sobrenadantes de mezclas de PEG-prote6na centrifugadas se mide y representa gr6ficamente de manera logar6tmica frente la concentraci6n de PEG. Se mezcl6 1:1 una disoluci6n de prote6nas de 20 mg/ml con disoluciones de PEG que oscilaban entre el 30 y el 50% de saturaci6n. Se eligieron estas condiciones bas6ndose en el perfil de solubilidad observado para el ESBA105 silvestre despu6s la determinaci6n emp6rica de la dependencia

lineal de Log S frente a la concentración de Peg (% p/v). En la figura 1 se representan curvas de solubilidad de varios ejemplos de ESBA105 variante que presentaban una solubilidad superior. En la tabla 7 también se proporciona una lista completa de valores de solubilidad.

Tabla 7. Actividad y solubilidad máxima estimada de los mutantes en comparación con el ESBA105 parental.

Molécula	E105	E105 Opt 1_0	E105 Opt 0_2	E105 Opt 1_2	E105 VH V103T	E105 VL V147A
Ordenada en el origen	1,956	2,228	2,179	2,163	2,223	2,047
Solubilidad máxima	90,36	169,04	151,01	145,55	167,11	111,43
Actividad con relación a ESBA105	1	1,4	1,5	1,5	1,2	2

5

e) Mediciones de estabilidad térmica

Se realizaron mediciones de estabilidad térmica para el ESBA105 parental y seguimientos de la solubilidad usando espectroscopía ATR-FTIR. Se sometieron las moléculas a una exposición térmica a un amplio intervalo de temperaturas (de 25 a 95°C). Se obtuvo el perfil de desnaturalización mediante la aplicación de una transformada de Fourier a las señales de interferograma (véase la figura 2). Se usaron los perfiles de desnaturalización para aproximar los puntos medios de las transiciones de desplegamiento térmico (TM) para cada variante de ESBA105 aplicando el modelo sigmoïdal de Boltzmann (tabla 8).

10

Tabla 8: Puntos medios de las transiciones de desplegamiento térmico (TM) para cada variante de solubilidad.

	ESBA105	E105 Opt 1.0	E105 Opt 1.2	E105 Opt 0.2	E105 VH V103T	E105 VL V147A
Boltzmann sigmoïdal						
Valores de ajuste óptimo						
INFERIOR	0,3604	-0,405	0,7032	0,4516	0,4691	-0,6873
SUPERIOR	100,4	99,3	98,84	99,04	99,2	99,16
V50	61,53	59,91	59,39	60,86	62,08	55,89
PENDIENTE	2,935	2,886	3,117	2,667	2,682	3,551
Desviación estándar						
INFERIOR	0,5206	0,3471	0,6652	0,4953	0,3938	0,4754
SUPERIOR	0,5361	0,3266	0,6116	0,4891	0,4167	0,3714
V50	0,1047	0,06658	0,1328	0,0949	0,07811	0,0919
PENDIENTE	0,09039	0,05744	0,1146	0,08199	0,06751	0,08235
Intervalos de confianza del 95%						

ES 2 629 345 T3

	ESBA105	E105 Opt 1.0	E105 Opt 1.2	E105 Opt 0.2	E105 VH V103T	E105 VL V147A
INFERIOR	de -0,7432 a 1,464	de -1,141 a 0,3309	de -0,7071 a 2,114	de -0,5984 a 1,502	de -0,3658 a 1,304	de -1,695 a 0,3206
SUPERIOR	de 99,25 a 101,5	de 98,61 a 99,99	de 97,54 a 100,1	de 98,01 a 100,1	de 98,32 a 100,1	de 98,38 a 99,95
V50	de 61,31 a 61,75	de 59,77 a 60,06	de 59,11 a 59,67	de 60,66 a 61,06	de 61,91 a 62,24	de 55,70 a 56,09
PENDIENTE	de 2,743 a 3,127	de 2,764 a 3,007	de 2,874 a 3,360	de 2,494 a 2,841	de 2,539 a 2,825	de 3,376 a 3,725
Bondad del ajuste						
Grados de libertad	16	16	16	16	16	16
R ²	0,9993	0,9997	0,999	0,9994	0,9996	0,9996
Suma absoluta de cuadrados	26,18	10,8	37,2	24	16,14	15,11
Sy.x	1,279	0,8217	1,525	1,225	1,004	0,9719

iii. Mediciones de agregación

5 También se analizaron ESBA105 y sus variantes de solubilidad en una prueba con dependencia temporal para evaluar el comportamiento de degradación y agregación. Para este fin, se incubaron proteínas solubles (20 mg/ml) a una temperatura elevada (40°C) en tampones fosfato a pH 6,5. Se mantuvieron muestras de control a -80°C. Se analizaron las muestras después de un periodo de incubación de dos semanas para determinar la degradación (SDS-PAGE) y agregación (SEC). Esto permitió descartar variantes que eran propensas a degradación (véase la figura 3) o que presentaban una tendencia a formar agregados solubles o insolubles (véase la tabla 9).

10

Tabla 9: Mediciones de agregación insoluble.

Proteína	Pérdida de proteína (agregados insolubles)
ESBA105	0-10%
ESBA105 Opt 1_0	0-10%
ESBA105 Opt 0_2	0-10%
ESBA105 Opt 1_2	45-50%
ESBA105 VH V103T	0-10%

iv. Expresión y repliegamiento de variantes de solubilidad

También se sometieron a prueba los mutantes de solubilidad para determinar la expresión y el rendimiento de repliegamiento con relación a la molécula de ESBA105 parental. En la tabla 10 se muestran los resultados de estos

estudios.

Tabla 10. Expresión y replegamiento de variantes de solubilidad.

	Residuo de superficie hidrófobo							Expresión con relación a ESBA105	Rendimiento de replegamiento, mg/l
	VH				VL				
ESBA105	L4	V12	V103	L144	V15	F52	V147	1,0	34
Opt 1_0					T			1,15	12,5
Opt 0_2		S		S				1,10	35
Opt 1_2		S		S	T			0,96	44
Opt 2_4	A	S	T	S	T		A	1,20	no puede producirse
VH L4A								1,0	no puede producirse
VH V103T			T					1,1	55
VL V147A							A	1,2	20

5 Aunque todos los mutantes de solubilidad hidrófilos presentaban una solubilidad mejorada en comparación con la molécula de ESBA105 parental, sólo algunas de estas moléculas se presentaron como adecuadas para otras propiedades biofísicas. Por ejemplo, muchas variantes tenían una estabilidad térmica y/o rendimiento de replegamiento reducidos con relación a la molécula de ESBA105 parental. En particular, el reemplazo hidrófilo en la posición VL147 disminuyó gravemente la estabilidad. Por tanto, se combinaron mutaciones de solubilidad que no afectaron significativamente a la estabilidad térmica y se sometieron a estrés térmico adicional para confirmar sus propiedades.

10 Tres mutantes que contenían una combinación de cuatro mutaciones de solubilidad diferentes (Opt1.0, Opt0.2 y VH:V103T) mejoraron significativamente la solubilidad de ESBA105 sin afectar a la reproducibilidad, actividad o estabilidad térmica. Sin embargo, un mutante que tenía las mutaciones combinadas de Opt1.0 y Opt0.2 en ESBA105 (Opt 1_2) presentaba un aumento de la cantidad de agregados insolubles después de la incubación durante 2 semanas a 40°C (véase la tabla 9). Esto podría explicarse por el papel de Val en la posición VL 15 en un giro de lámina beta, puesto que Val tiene la mayor propensión a formar láminas beta de todos los aminoácidos. Este resultado demostró que se tolera una mutación de solubilidad individual en la posición VL 15, pero no en combinación con mutantes de solubilidad que perturban otros parches hidrófobos. Por tanto, se seleccionaron las mutaciones contenidas en Opt0_2 y VH:V103T como las de mejor desempeño para mejorar propiedades de solubilidad de moléculas de scFv.

EJEMPLO 2: Generación de scFv con solubilidad y estabilidad potenciadas

25 Se optimizaron adicionalmente las variantes de ESBA105 identificadas mediante diseño de solubilidad, mediante sustitución con mutaciones estabilizantes identificadas mediante el ensayo de control de calidad (QC). Se crearon un total de 4 constructos que contenían entre 1 y 3 de las mutaciones de solubilidad identificadas en el ejemplo 1 anteriormente, en combinación con todas las mutaciones estabilizantes encontradas en QC 7.1 y 15.2 (es decir, D31N y V83E en el dominio VL y V78A, K43 y F67L en el dominio VH). Todos los constructos optimizados produjeron más proteína soluble que un scFv silvestre (véase la tabla 11). El mejor constructo presentaba de manera sistemática un aumento de más de 2 veces de la solubilidad con respecto al silvestre. No se vieron afectadas significativamente ni la actividad ni la estabilidad de las moléculas de scFv por la combinación de mutaciones estabilizantes y potenciadoras de la solubilidad.

Tabla 11: ScFv con una solubilidad y estabilidad optimizadas

Proteína	Mutaciones de VL/VH	T _m de FTIR (°C)	Solubilidad de PEG (mg/ml)	Actividad con relación a E105	kD
QC7.1D-N-15.2	VL: D31N; V83E VH: V78A; K43R; F67L	69,0	90	1,7	9,06 x 10 ⁻¹⁰
QC7.1D-N-15.2 VH V103T	VL: D31N; V83E VH: V78A; K43R; F67L; V103T	68,9	106	1,5	8,79 x 10 ⁻¹⁰
QC7.1D-N-15.2 Opt 0_2	VL: D31N; V83E VH: V12S; V78A; K43R; F67L; L144S	66,6	121	1,2	8,12 x 10 ⁻¹⁰
QC7.1D-N-15.2 VH V103T Opt 0_2	VL: D31N; V83E VH: V12S; V78A; K43R; F67L; V103T; L144S	67,3	186	1,5	1,34 x 10 ⁻⁹

Se usaron los valores de solubilidad para las 4 variantes para deconvolucionar la contribución de cada mutación a la solubilidad del scFv. Todas las mutaciones parecieron contribuir a la solubilidad del scFv de manera aditiva aunque varios de estos residuos estén relativamente próximos entre sí tanto en la secuencia primaria como dentro de la estructura 3D. El análisis indicó que una combinación de tres mutaciones potenciadoras de la solubilidad en el dominio VH (V12S, L144S, V103T (o V103S)) representaba ~60% de la solubilidad de scFv. Puesto que los parches hidrófobos están conservados en los dominios variables de todos los agentes de unión inmunológica, esta combinación óptima de mutaciones puede usarse para mejorar la solubilidad de prácticamente cualquier scFv u otra molécula de agente de unión inmunológica.

Ejemplo 3: Variante de solubilidad optimizada de Epi43máx, un potente agente de unión de TNF α

La tabla 12 representa datos de caracterización para tres variantes optimizadas de Epi43máx, un potente agente de unión de TNF. EP43_máxDHP es una variante potenciada de solubilidad de EP43máx y comprende las tres mutaciones que potencian la solubilidad anterior (V→S en la posición de AHo 12, V→T en la posición de AHo 103, y L→T en la posición de AHo 144). Se generaron las variantes EP43_máxmín y EP43_mínmax mediante selección aleatoria de dominios entre injertos "mín" y "máx". En particular, la variante "mínmax" comprende la versión de injerto mínimo (injerto de CDR únicamente) de la cadena ligera y la versión de injerto máximo de la cadena pesada (es decir, CDR de conejo injertados más residuos de región de marco de conejo implicados en la unión a antígeno). En cambio, la variante "máxmín" comprendía la versión de injerto máximo de la cadena ligera y la versión de injerto mínimo de la cadena pesada. Las curvas de desnaturalización térmica de EP43máx y sus variantes optimizadas se compararon mediante análisis de FTIR (véase la figura 4). Se encontró que Epi43mínmax tenía un punto medio de desplegamiento inferior que Epi43máx. Además, la variante mínmax presentó una etapa que desplegaba la transición, indicando que ambos dominios se despliegan a temperaturas muy similares.

ES 2 629 345 T3

Tabla 12: Datos de caracterización biofísica para tres variantes optimizadas de Epi43máx, un potente agente de unión de TNF.

	FW	L929*	Kon	Kaff	KD	Estabilidad de FT-IR tm°C	Rendimiento de RF	Expresión	Detección de replegamiento	Purificación
EP43_máx	1,4	6,4	2,28E+05	5,68E-05	2,49E-10	74,32	21,73	+++	Ok	Ok
EP43_máxDHP	1,4	6,7	2,35E+05	2,73E-05	1,16E-10	60,15	17	+++	Ok	Ok
EP43_máxmín	1,4	Inactivo	1,46E+05	5,33E-03	3,66E-08	51,76	11	+++	Ok	Ok
EP43_mín máx	1,4	1,6	2,28E+05	1,98E-04	8,68E-10	65,81	46	+++	Ok	ok
*L929 [EC50-E105/EC50-X], comparado en unidades de masa [ng/ml]										

Ejemplo 4: Derivados con solubilidad potenciada de agentes de unión inmunológica de VEGF

- 5 Además de los agentes de unión inmunológica de TNF descritos anteriormente (ESBA105 y Epi43máx), se modificaron mediante ingeniería genética varios derivados de solubilidad de agentes de unión inmunológica de VEGF según los métodos de la invención. En particular, estas variantes de agente de unión inmunológica de VEGF se modificaron mediante ingeniería genética para tener un parche hidrófobo alterado ("DHP") seleccionado los siguientes residuos: (a) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y (c) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144. Las características biofísicas de estas variantes de DHP se compararon con sus equivalentes silvestres. Estas características incluían temperatura de fusión o Tm (tal como se determina mediante Bio-ATR), el porcentaje de pérdida de láminas β a 60°C (tal como se determina mediante AquaSpec), el porcentaje de pérdida de proteínas tras precipitación a 60°C, solubilidad mediante precipitación de sulfato de amonio, rendimiento de replegamiento en producción y niveles de expresión en *E. coli*.

20 Tal como se representa en la tabla 14 a continuación, la solubilidad de uno de los agentes de unión inmunológica de VEGF (ESBA578mín máx FW1.4 DHP) se potenció significativamente mediante la introducción del motivo de DHP. Además, otras propiedades biofísicas (por ejemplo, estabilidad térmica) o bien no resultaron afectadas de manera adversa o bien mejoraron por la introducción del motivo. Las curvas de estabilidad térmica usadas para determinar la temperatura de fusión para 578mín-máx y su variante de solubilidad optimizada (578mín-máx_DHP) se representan en la figura 5 y la tabla 13, mientras que las curvas de precipitación de sulfato de amonio usadas para determinar los valores de solubilidad se representan en la figura 6.

Tabla 13

	Epi43máxDHP(941)	Epi43máxmín (959)	Epi43máx (676)	Epi43mínmax (958)
V50	60,15	65,81	77,78	51,76
PENDIENTE	2,618	2,908	10,43	4,297
R ²	0,9974	0,9969	0,9855	0,9936

Tabla 14: Caracterización biofísica de agentes de unión inmunológica de VEGF

Agente de unión inmunológica	TM [°C]	% de pérdida de láminas β	% de pérdida de proteínas	Solubilidad [CE50 en % de saturación de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$]	Rendimiento de replegamiento (mg/L)	Nivel de expresión (unidades arbitrarias)
578-máx	70.36	-1.93%	16.20%	27.24	12.5	+
578-máx FEW1.4_DHP	ND	ND	ND	ND	11.6	+
578-mín-máx	71.12	-0.52%	10.99%	28.13	23.93	+++
578-mín-máx FEW1.4_DHP	70.18	-0.15%	14.82%	32.36	50.5	+++

REIVINDICACIONES

1. Agente de unión inmunológica que comprende uno de los siguientes motivos que potencian la solubilidad en las posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 (numeración de AHO):

(a) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

5 (b) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o

(a1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

(b1) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c1) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144; o

10 (a2) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

(b2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y

(c2) treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144.

2. Agente de unión inmunológica según la reivindicación 1, que comprende además

(a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31;

15 (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83;

(c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43;

(d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67; y/o

(e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78.

20 3. Método para potenciar la solubilidad de un agente de unión inmunológica, comprendiendo el agente de unión inmunológica una región variable de cadena pesada (V_H), o fragmento de la misma, comprendiendo el método:

A) seleccionar al menos tres posiciones de aminoácido dentro de la región de V_H para la mutación; y

B) mutar las al menos tres posiciones de aminoácido seleccionadas para la mutación,

25 en el que las al menos tres posiciones de aminoácido son las posiciones de aminoácido de cadena pesada 12, 103 y 144 (según el convenio de numeración de AHO) y la mutación comprende la sustitución del aminoácido en las posiciones de aminoácido seleccionadas frente a un aminoácido hidrófilo.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el aminoácido hidrófilo es

(a) serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12;

(b) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y/o

(c) serina (S) o treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144.

30 5. Método según la reivindicación 3 ó 4, en el que el aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada para la mutación es un aminoácido hidrófobo.

6. Método según la reivindicación 5, en el que el aminoácido hidrófobo es leucina (L) o valina (V).

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el aminoácido seleccionado para la mutación de

- (a) el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 12 es valina (V);
 - (b) el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 103 es valina (V); y
 - (c) el aminoácido en la posición de aminoácido de cadena pesada 144 es leucina (L).
- 5 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que la estabilidad térmica, el replegamiento, el rendimiento de expresión, la agregación y/o la actividad de unión del agente de unión inmunológica no resultan adversamente afectados por la mutación.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que la mutación da como resultado al menos un aumento de 2 veces en la solubilidad.
- 10 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que la mutación comprende además la etapa de introducir una o más mutaciones en una posición de aminoácido (convenio de numeración de AHo) seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido de cadena ligera 31;
 - (b) ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido de cadena ligera 83;
 - (c) arginina (R) en la posición de aminoácido de cadena pesada 43;
 - 15 (d) leucina (L) en la posición de aminoácido de cadena pesada 67; y
 - (e) alanina (A) en la posición de aminoácido de cadena pesada 78.
11. Agente de unión inmunológica preparado según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10.
12. Agente de unión inmunológica según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 11, que es un anticuerpo scFv, una inmunoglobulina de longitud completa, un fragmento Fab, un Dab o un Nanobody.
- 20 13. Agente de unión inmunológica según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 11 ó 12 en el que el agente de unión inmunológica se une específicamente a TNF α humano o a VEGF humano.
14. Composición que comprende el agente de unión inmunológica según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 11, 12 ó 13 y un portador farmacéuticamente aceptable.

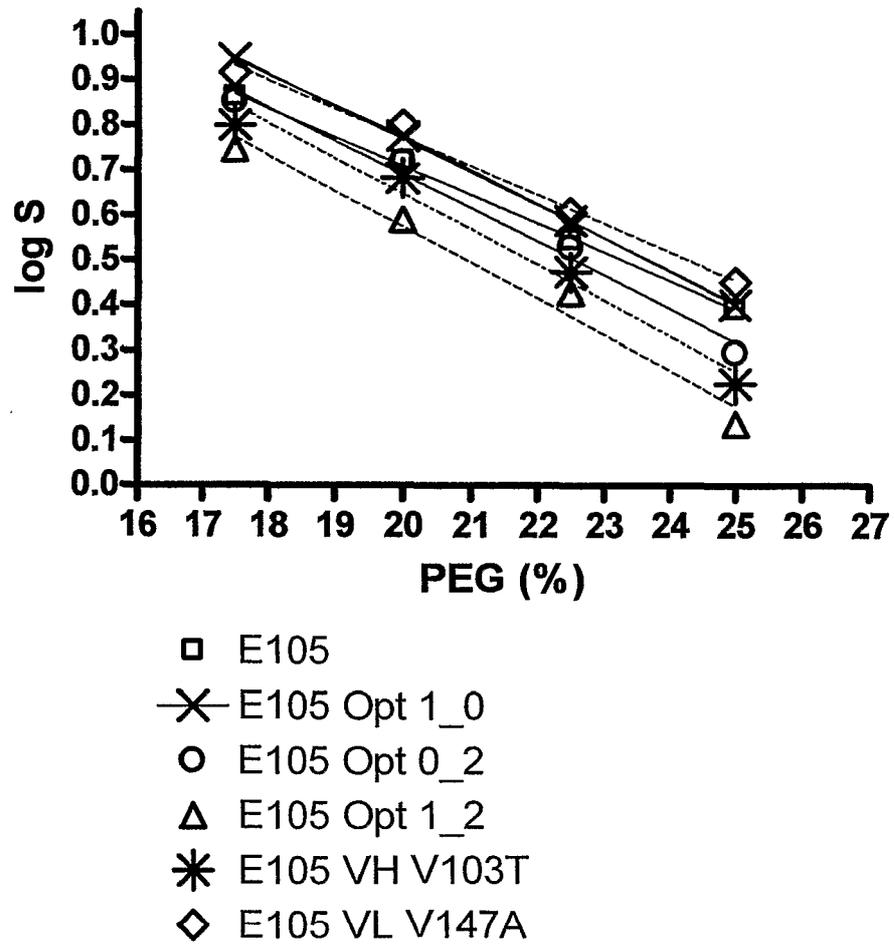
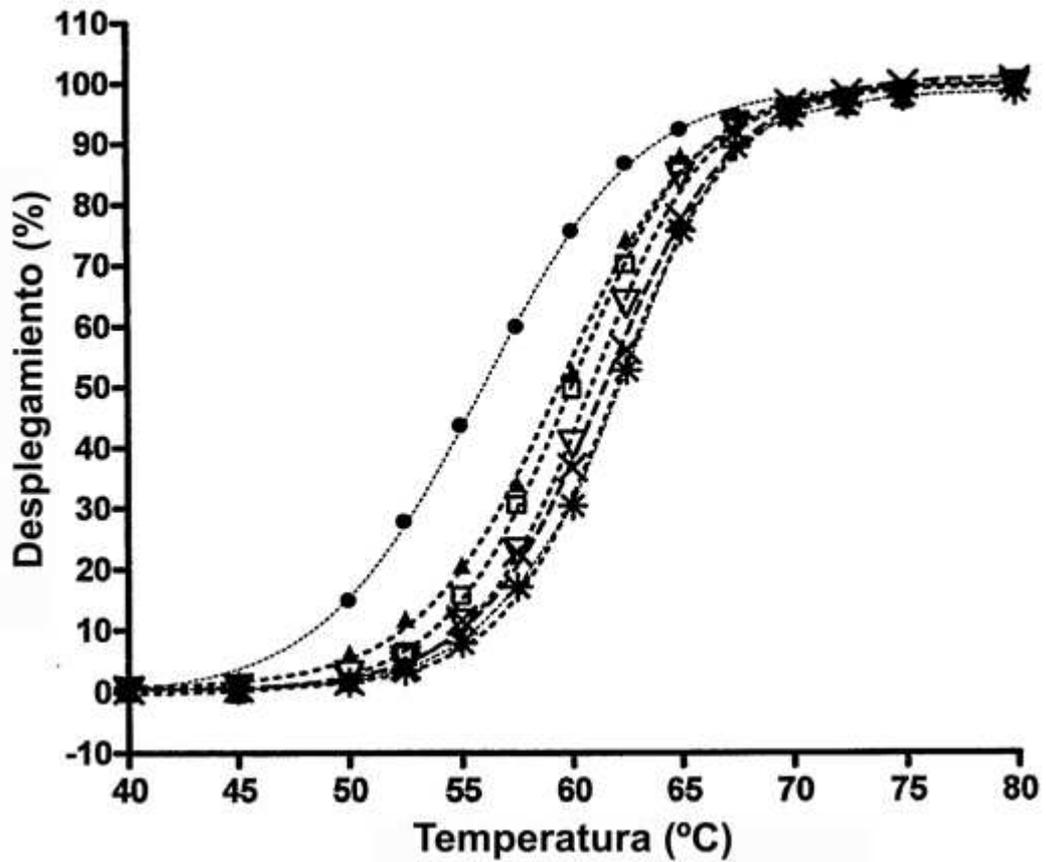


Fig. 1



- X ESBA105
- E105 Opt1.0
- ▲ E105 Opt1.2
- ▽ E105 Opt0.2
- * E105 VH V103T
- E105 VL V147A

Fig. 2

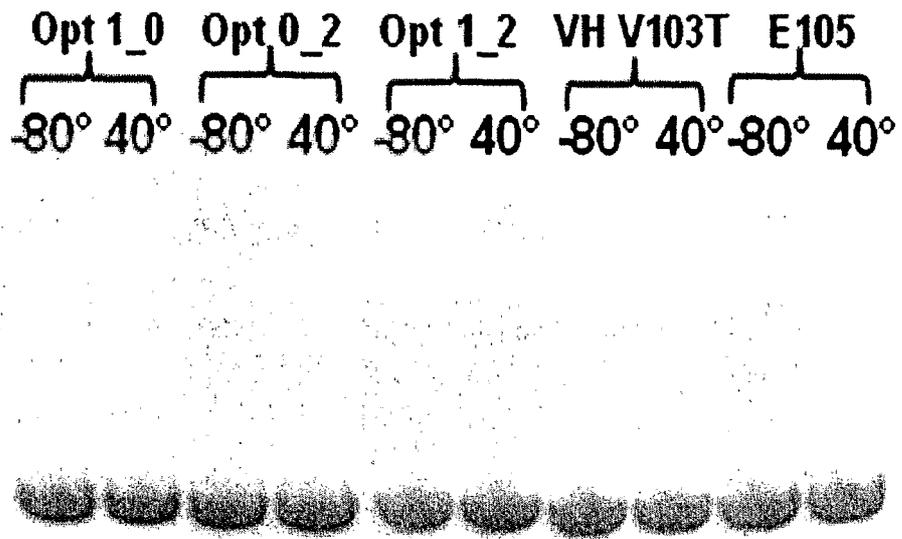


Fig. 3

**Curvas de desplegamiento térmico_BioATR-FT-IR
_Agentes de unión de TNF α de 2^a generación**

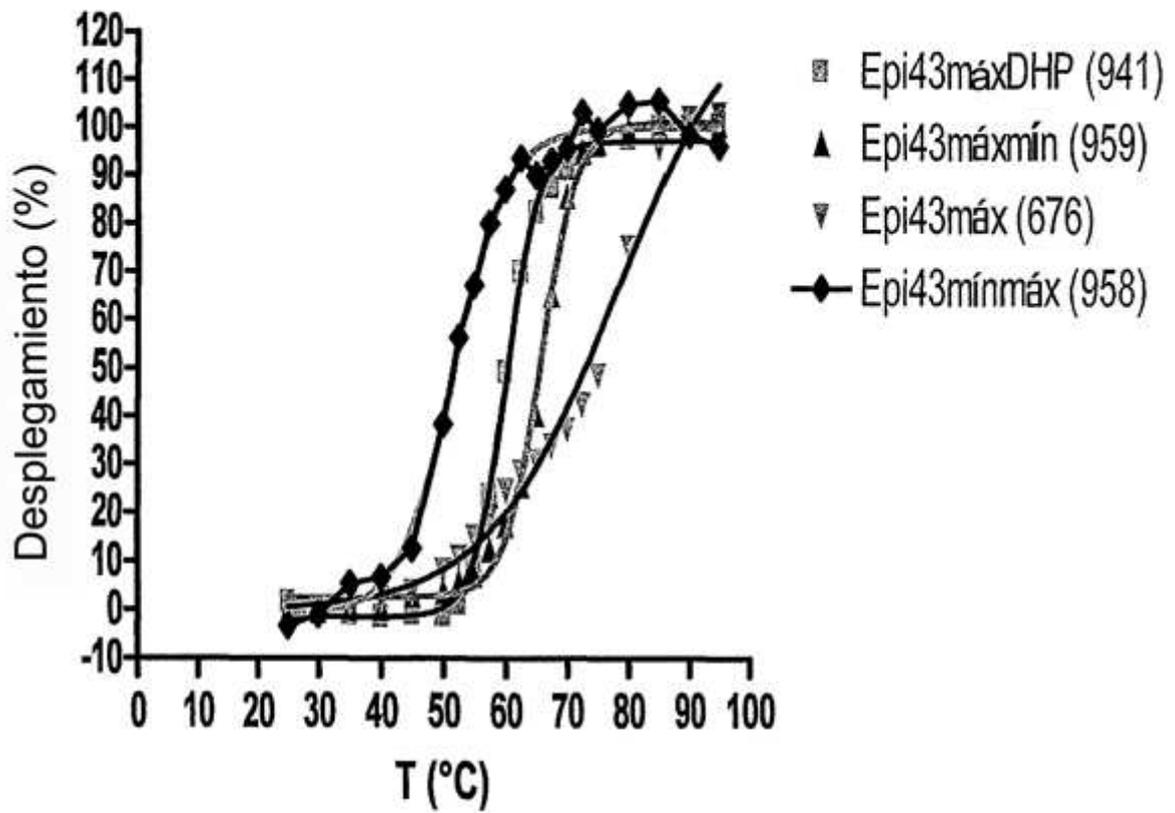


Fig. 4

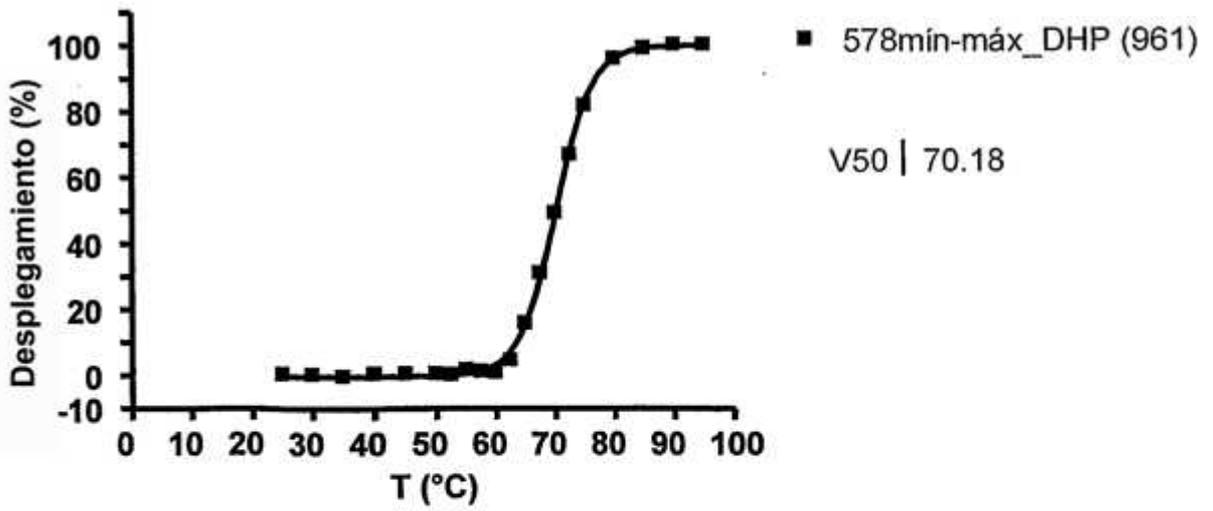
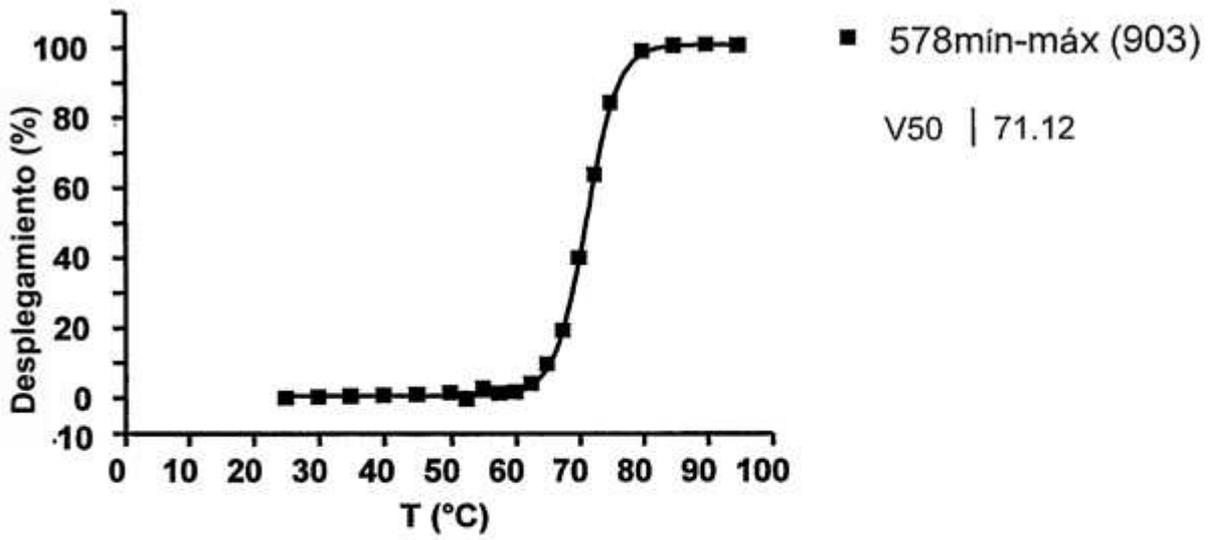


Fig. 5

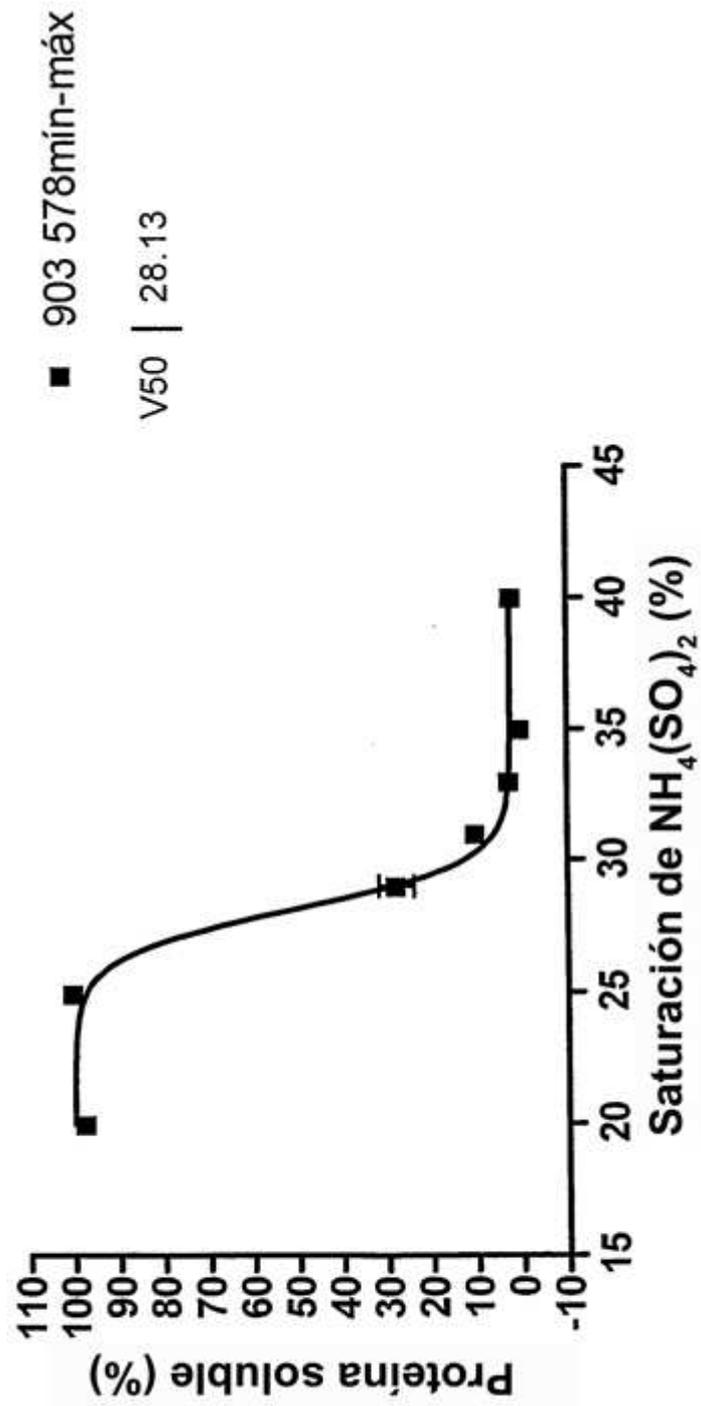


Fig. 6a

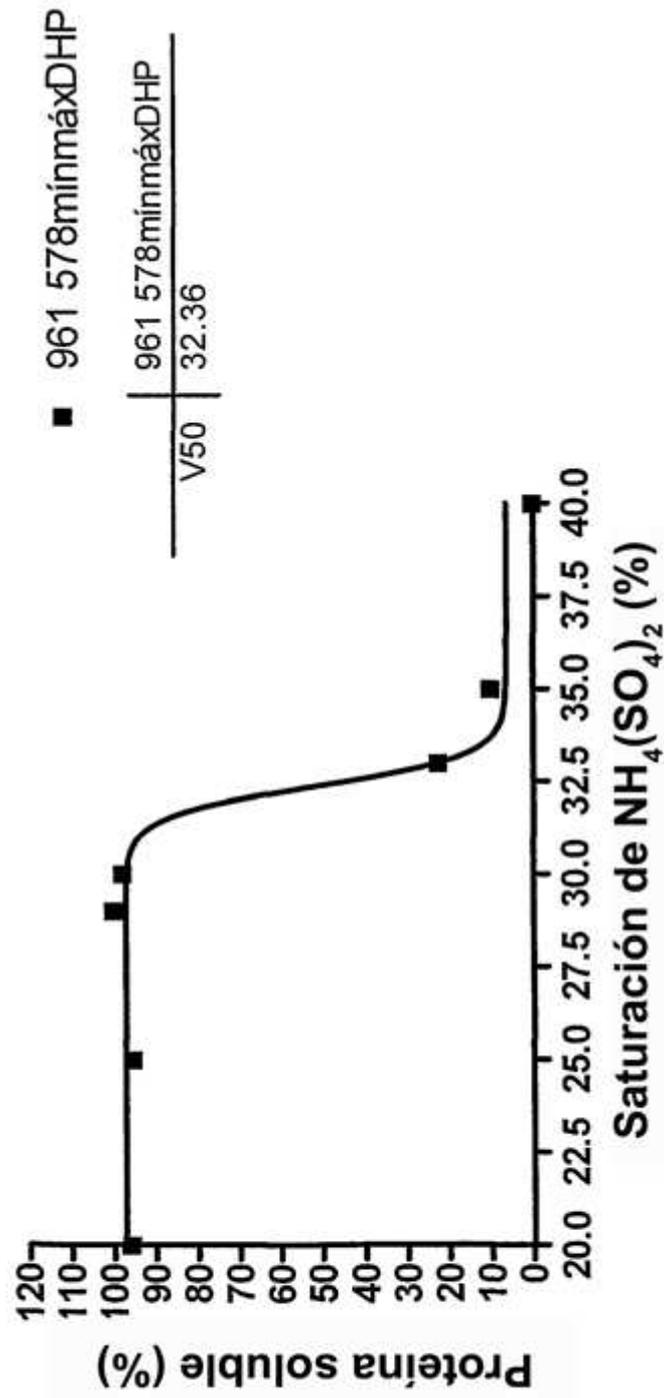


Fig. 6b