

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 446**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010** **E 15156284 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2896404**

54 Título: **Métodos para la identificación de sitios para conjugación de IgG**

30 Prioridad:

04.06.2009 US 184084 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2017

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)

72 Inventor/es:

CHENNAMSETTY, NARESH;
HELK, BERNHARD;
KAYSER, VEYSEL;
TROUT, BERNHARDT y
VOYNOV, VLADIMIR

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 643 446 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

Métodos para la identificación de sitios para conjugación de IgG**Campo de la invención**

5 La presente divulgación se refiere a inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina mejorados.

Antecedentes

10 Los anticuerpos monoclonales se usan en gran medida en laboratorio y terapia. Derivados de anticuerpo con fluorescencia específica de sitio diseñada o propiedades de enlace se han desarrollado y usado durante muchos años. Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos como agentes terapéuticos, presentando en la actualidad la clase de medicamentos que crece de manera más rápida [1]. Los anticuerpos son proteínas multidominio de dos cadenas ligeras o cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro. Las regiones variables especifican el enlace con n antígeno particular, y parte de la región constante es responsable de las funciones del efector pro medio del enlace con los receptores Fc sobre la superficie de células inmunes. Debido a su potencial en la cura de varias enfermedades, actualmente los anticuerpos constituyen la clase de terapia humana que está creciendo de manera más rápida (Carter. Nature Reviews Immunology. 2006, 6(5), 343). Desde 2001, su mercado ha crecido a un ritmo de crecimiento medio anual de 35%, el índice más alto entre todas las categorías de fármacos de biotecnología (S. Aggarwal. Nature. BioTech. 2007, 25 (10) 1097).

20 El diseño de conjugados de anticuerpo ha incrementado además la versatilidad de aplicaciones de anticuerpo. En muchas técnicas de laboratorio, las enzimas o sondas fluorescentes se conjugan con anticuerpos para realizar funciones de ensayos, por ejemplo cuantificación de abundancia de antígenos. En casos de terapias destinadas, las moléculas tóxicas pequeñas se unen a anticuerpos que específicamente se enlazan con biomarcadores en células dañadas [2-4]. Se han buscado varias técnica para conjugación de anticuerpos, por ejemplo, unión a lisinas de superficie [5], a carbohidratos Fc [6] o a disulfuros de intercadena parcialmente reducidos [7].

30 La conjugación de anticuerpos con cisteína de superficie diseñada sigue siendo una opción muy atractiva porque la mayoría de anticuerpos no tienen cisteínas aparte de las consumidas en los enlaces disulfuro intra- o intercadena. Las moléculas pequeñas pueden estar unidas al sitio específico de sustitución de cisteína por medio de una química reactiva de tiol tal como maleimidas [8-14]. Se ha preferido el diseño en los dominios C_H1 y C_H3 para evitar la interferencia con enlace de antígeno de las regiones variables y la función del efector de C_H2. Se han considerado diferentes criterios para la conjugación exitosa de anticuerpos por medio de cisteínas diseñadas. Por ejemplo, el dominio de anticuerpo en el que para realizar una mutación, la exposición al sitio mutado y el aminoácido que se sustituirá son algunas de las variables que se toman en cuenta. Se ha desarrollado una técnica de cribado de alto rendimiento para identificar sitios adecuados para diseño y conjugación de cisteínas [15]. Dos de los problemas más comunes asociados con las variantes de cisteína de anticuerpo son la oligomerización y el etiquetado pobre. Aún no hay una herramienta universal para predecir si una variante de cisteína de anticuerpo será estable y se conjugará de manera eficiente. Además, las variantes de cisteína actualmente existen solamente para los dominios C_L, C_H1 y C_H3 [8, 9, 11, 12, 15].

45 Así, existe una necesidad de variante de cisteína de inmunoglobulina adicionales que puedan usarse en la generación de conjugados estables de inmunoglobulina.

Resumen de la invención

50 La invención proporciona un conjugado de inmunoglobulina, que comprende una inmunoglobulina que tiene al menos una mutación en el residuo 20 (V_L), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula está conjugado con el residuo de cisteína.

La invención también proporciona una inmunoglobulina modificada o aislada que comprende al menos una mutación en el el residuo 20 (V_L), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína.

55 La invención proporciona además un polinucleótido aislado o recombinante que codifica una inmunoglobulina de la invención.

La invención proporciona un vector que comprnde un polinucleótido de la invención operativamente unido a un promotor inducible.

60 La invención también proporciona una célula huésped que comprende un vector de la invención.

La invención proporciona además un método para producir una inmunoglobulina que comprende: (a) proporcionar un medio de cultivo que comprende una célula huésped de la invención; y (b) colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales se expresa la inmunoglobulina.

La invención proporciona un método para producir un conjugado de inmunoglobulina, que comprende: (a) proporcionar la inmunoglobulina de la invención; (b) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos; y (c) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactiva con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina.

La invención también proporciona un método para reducir el enlace cruzado entre cisteínas expuestas a la superficie de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica altamente concentrada de conjugados de inmunoglobulina que comprende: (a) proporcionar una inmunoglobulina; (b) sustituir el residuo 20(V_L) con un residuo de cisteína, (c) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos; (d) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde la molécula es reactiva con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina; y (e) generar una formulación líquida altamente concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración del conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml.

La invención proporciona el uso del conjugado de inmunoglobulina de la invención en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida muy concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml, y donde al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado.

La invención también proporciona el uso del conjugado de inmunoglobulina de la invención como una herramienta de diagnóstico.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el conjugado de inmunoglobulina de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado, y/o donde el conjugado de inmunoglobulina está a una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml.

Resumen de la divulgación

Aquí se describen inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina mejorados que muestran enlace cruzado reducido que cumplen esta necesidad.

Así un aspecto incluyen un conjugado de inmunoglobulina que comprende una inmunoglobulina que tiene la menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo consistente en 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L), 25(V_H), 125(C_{H1}), 248(C_{H2}), 254(C_{H2}), 286(C_{H2}), 298(C_{H2}) y 326(C_{H2}), donde al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula se conjuga con el residuo de cisteína. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L) y 125(C_{H1}). En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en 248(C_{H2}) y 326(C_{H2}). En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en 254(C_{H2}) y 286(C_{H2}). En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en 298(C_{H2}) y 326(C_{H2}). En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un IgG1. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H1}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H2}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H3}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano V_H. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano V_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende además una molécula enlazadora que tiene al menos dos sitios reactivos, donde un primer sitio reactivo está unido al residuo de cisteína de la inmunoglobulina y un segundo sitio reactivo está unido al átomo o molécula. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes que tienen una molécula enlazadora, la molécula enlazadora se selecciona del grupo consistente en

una hidrazona, un disulfuro, un péptido, un agente quelante y una maleimida. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula se selecciona del grupo consistente en un radionúclido, un agente quimioterapéutico, una toxina microbiana, una toxina de planta, un polímero, un carbohidrato, una citoquina, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta enzima-sustrato, una enzima, un péptido, un péptido mimético, un nucleótido, un siARN, un microARN, un ARN mimético y un aptámero. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula se selecciona del grupo consistente en ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{213}Bi , ^{211}At , una calicheamicina, una duocarmicina, un maitansinoide, una auristatina, una antraciclina, exotoxina A Pseudomona, toxina de Difteria, ricina, polietilenglicol, almidón de hidroxietilo y un residuo de manosil. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula reduce la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula aumenta la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina puede además comprender una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Otro aspecto incluye una inmunoglobulina modificada o aislada que comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo consistente en $7(\text{V}_\text{H})$, $20(\text{V}_\text{L})$, $22(\text{V}_\text{L})$, $25(\text{V}_\text{H})$, $125(\text{C}_{\text{H}1})$, $248(\text{C}_{\text{H}2})$, $254(\text{C}_{\text{H}2})$, $286(\text{C}_{\text{H}2})$, $298(\text{C}_{\text{H}2})$ y $326(\text{C}_{\text{H}2})$, donde al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en $7(\text{V}_\text{H})$, $20(\text{V}_\text{L})$, $22(\text{V}_\text{L})$ y $125(\text{C}_{\text{H}1})$. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en $248(\text{C}_{\text{H}2})$ y $326(\text{C}_{\text{H}2})$. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo seleccionado del grupo consistente en $25(\text{V}_\text{H})$ y $286(\text{C}_{\text{H}2})$. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación es un residuo $254(\text{C}_{\text{H}2})$. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un IgG1. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano $\text{C}_{\text{H}1}$. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano $\text{C}_{\text{H}2}$. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano $\text{C}_{\text{H}3}$. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano C_L . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano V_H . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano V_L . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende además una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Otro aspecto incluye polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican las inmunoglobulinas del aspecto precedente de inmunoglobulina modificada y todas las combinaciones de las realizaciones precedentes. En ciertas realizaciones, el polinucleótido está en un vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, un promotor inducible está operativamente unido al polinucleótido. Otro aspecto incluye células huéspedes con el vector de cualquiera de las realizaciones precedentes. En ciertas realizaciones, las células huéspedes son capaces de expresar la inmunoglobulina codificada por el polinucleótido.

Otro aspecto incluye métodos para producir una inmunoglobulina que comprende proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped del aspecto precedente y colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales la inmunoglobulina se expresa. En ciertas realizaciones, le método incluye una etapa adicional de aislar la inmunoglobulina expresada.

Otro aspecto incluye métodos para producir un conjugado de inmunoglobulina que comprende proporcionar la inmunoglobulina del aspecto precedente de inmunoglobulina modificada y todas las combinaciones de las realizaciones precedentes, reducir uno o más de los residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos e incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactivo con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina.

Otro aspecto incluye métodos para reducir el enlace cruzado entre cisteínas expuestas a la superficie de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica muy concentrada de conjugados de inmunoglobulina que comprende proporcionar una inmunoglobulina, sustituir un residuo seleccionado del grupo consistente en $7(\text{V}_\text{H})$, $20(\text{V}_\text{L})$, $22(\text{V}_\text{L})$, $25(\text{C}_{\text{H}1})$ con un residuo de cisteína, reducir uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos, incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde la molécula es reactiva con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina, y

generar una formulación líquida muy concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración de conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina comprende un IgG1. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H1}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H2}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H3}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano V_H. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano V_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Otro aspecto incluye usos del aspecto precedente de conjugado de inmunoglobulina y cualquiera de las combinaciones de las realizaciones precedentes para la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida muy concentrada donde el conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de fallo cardíaco congestivo (FCC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras condiciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de la médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; osteopenia difusa; malnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhan, lesión de médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa polioestótica, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, tratamiento de dolor agudo e hipercalcemia humoral maligna, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo a trasplante, infecciones virales, neoplasias hematológicas y condiciones de tipo neoplástico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas de no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfático pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de célula del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de zona marginal, leucemia de células peludas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocito, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluyendo leucemias de célula T periférica, leucemias de célula T/linfomas de célula T en adultos y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhan, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo LMA con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo tumores del cerebro (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofarínge, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer ovárico, cáncer primario de hígado o cáncer endometrial y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondil artritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerodermia, enfermedad injerto contra huésped (EICH), rechazo de injerto de islote alogénico, malignidades hematológicas, tales como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA), inflamación asociada con tumores, lesión de nervio periférico o enfermedades desmielinizantes. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerosa, linfoma de no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorectal, artritis idiopática juvenil, degeneración macular, virus sincicial respiratorio, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por tratamientos, metástasis ósea, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiples. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la formulación comprende al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado. En ciertas realizaciones, el porcentaje de monómeros se mide mediante análisis SDS-PAGE no reductor.

Otro aspecto incluye usos del aspecto precedente de conjugado de inmunoglobulina y cualquiera de las combinaciones de las realizaciones precedentes como un principio activo farmacéutico no oligomerizante.

Otro aspecto incluye usos del aspecto precedente de conjugado de inmunoglobulina y cualquiera de las combinaciones de las realizaciones precedentes como una herramienta de diagnóstico.

Otro aspecto incluye usos del aspecto precedente de conjugado de inmunoglobulina y cualquiera de las combinaciones de las realizaciones precedentes como un estándar para proteínas de alto peso molecular. Otros aspectos incluyen usos de un conjugado de inmunoglobulina como un estándar para proteínas de alto peso molecular, donde el conjugado de inmunoglobulina comprende una inmunoglobulina que tiene al menos una mutación en el residuo 440 (C_{H3}), donde el al menos un residuo es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula se conjuga con el residuo de cisteína.

Otro aspecto incluye composiciones farmacéuticas que incluyen un conjugado de inmunoglobulina del aspecto precedente de conjugado de inmunoglobulina y cualquiera de las combinaciones de las realizaciones precedentes y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el conjugado de inmunoglobulina está en una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado.

Otro aspecto incluye métodos para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para mutación a cisteína que comprende calcular el código Propensión a Agregación Espacial de un primer residuo de aminoácido sobre la superficie de la inmunoglobulina, calculando la Propensión a agregación espacial de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina en inmediata proximidad del primer residuo, y seleccionando el primer residuo de aminoácido para mutación a cisteína si la propensión a agregación espacial del primer residuo de aminoácido es igual o está entre los valores de 0 y -0,11 y si la pluralidad de residuos tienen Espacio-Agregación-Propensiones inferiores a 0. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 15Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 10Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 7,5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el cálculo de propensión a agregación espacial de un residuo comprende el cálculo de propensión a agregación espacial para una región esférica con un radio centrado en átomo en el residuo. En ciertas realizaciones, el radio de la región esférica es al menos 5Å.

Otro aspecto incluye inmunoglobulinas modificadas o aisladas que comprenden al menos una mutación de un residuo expuesto a la superficie con cisteína, donde la propensión a agregación espacial del residuo es igual o está entre los valores de 0 y -0,11 y donde las propensiones a agregación espacial de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina en inmediata proximidad del primer residuo tienen propensiones de agregación espacial inferiores a 0. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 15Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 10Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 7,5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está dentro de 5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la propensión a agregación espacial se calcula para una región esférica con un radio centrado en átomo en el residuo. En ciertas realizaciones, el radio es al menos 5Å.

Otro aspecto incluye métodos para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para mutación a cisteína que comprende elegir una pluralidad de residuos de aminoácido de la inmunoglobulina, donde la pluralidad de residuos se expone sobre la superficie de la inmunoglobulina, mutando un residuo de la pluralidad de residuos a un residuo de cisteína, conjugando el residuo de cisteína con un átomo o molécula para formar un conjugado de inmunoglobulina, evaluando al conjugado de inmunoglobulina para propensión a enlace cruzado y asignando al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado, y seleccionando al residuo para mutación a cisteína si el valor de propensión a enlace cruzado es I o II. En ciertas realizaciones, el método comprende además asignar al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado de II si menos del 5% del conjugado de inmunoglobulina forma dímeros y si el conjugado de inmunoglobulina no forma trímeros donde la formación de dímeros y trímeros se mide mediante SDS-PAGE comparativo reductor y no reductor. En ciertas realizaciones, el método comprende además asignar al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado de I si menos del 1% del conjugado de inmunoglobulina forma dímeros donde la formación de dímeros se mide mediante SDS-PAGE comparativo reductor y no reductor.

A lo largo de la especificación pueden encontrarse aspectos y realizaciones adicionales de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente divulgación se refiere a inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina mejorados que muestran enlace cruzado reducido. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas de la divulgación se modifican en residuos específicos mediante sustitución con cisteína. La divulgación proporciona inmunoglobulinas y conjugados

de inmunoglobulina modificados, métodos para hacer tales inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina, moléculas multivalentes o multi-específicas que comprenden tales inmunoglobulinas y composiciones farmacéuticas que contienen las inmunoglobulinas, conjugados de inmunoglobulina o moléculas bi-específicas de la divulgación.

5 Definiciones

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina” como aquí son referidos incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de enlace de antígeno (esto es, “parte de enlace de antígeno”) o cadenas sencillas de los mismos. Un “anticuerpo” que ocurre de manera natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variables de cadena pesada (aquí abreviada como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, $CH1$, $CH2$ y $CH3$. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio CL . Las regiones V_H y V_L pueden además subdividirse en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinadas de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs dispuestas a partir de amino terminal y carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables en las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina con tejidos o factores huéspedes, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

Los términos “conjugado de anticuerpo” o “conjugado de inmunoglobulina” como aquí son referidos incluyen cualquier inmunoglobulina, fragmento de enlace de antígeno, o cadenas sencillas de los mismos químicamente o biológicamente unidas a un átomo o moléculas. Los átomos o moléculas pueden incluir, por ejemplo, una citotoxina; agente radioactivo, fármaco anti-tumoral o agente terapéutico. El conjugado de anticuerpo mantiene la inmunoreactividad de la inmunoglobulina o fragmento de enlace de antígeno, esto es, la inmunoglobulina o fragmento de enlace de antígeno del conjugado de anticuerpo tiene al menos setenta por ciento, al menos setenta y cinco por ciento, al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos cien por ciento, al menos ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina antes de la conjugación con el átomo o molécula.

Los términos “parte de enlace de antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de antígeno”), como aquí se usa, se refiere a la longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la habilidad para enlazarse específicamente con un antígeno y al menos un aparte de la región constante de la cadena pesada o ligera. Se ha demostrado que la función del enlace de antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de enlace incluidos en los términos “parte de enlace de antígeno” de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios V_L , V_H , CL y $CH1$; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd consistente en los dominios V_H y $CH1$; y un fragmento Fv consisten en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que posibilita que se hagan como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocida como cadena Fv sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencillas también pretenden incluirse en el término “región de enlace de antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un anticuerpo o inmunoglobulina “aislada”, como aquí se usan, se refieren a un anticuerpo o inmunoglobulina que está sustancialmente libre de otros componentes en los que tales anticuerpos o inmunoglobulinas se encuentran de manera natural. Además, un anticuerpo o inmunoglobulina aislada puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como aquí se usan se refieren a la preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal típicamente muestra una única especificidad y afinidad de enlace para un epítope particular.

Los términos “anticuerpo humano”, como aquí se usan, pretenden incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal

humana o anticuerpo que contiene secuencias marco de consenso derivadas de análisis de secuencias marco humanas como se describe en Knappik, et al. (2000 J Mol Biol 296, 57-86).

Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas aleatoriamente o mutagénesis específica de sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo). Sin embargo, los términos “anticuerpo humano”, como aquí se usan, no pretenden incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

El término “dominio humano”, como aquí se usa, pretende incluir dominios de región constante de inmunoglobulina derivados de secuencias de origen humano, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco de consenso derivadas de análisis de secuencias marco humanas como se describe en Knappik, et al. (2000 J Mol Biol 296, 57-86).

El término “anticuerpo humano recombinante”, como aquí se usa, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpo aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformados para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpo humano recombinante, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique la unión de todo o una parte de un gen o secuencias de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco o CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y así las secuencias de aminoácido de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras que las secuencias V_H y V_L derivadas de y relacionadas con la línea germinal humana pueden no existir de manera natural el repertorio de línea germinal de anticuerpo humano in vivo.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, sustituye o intercambia de tal manera que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se una a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula completamente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor del crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variables, o una parte de la misma se altera, sustituye o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede modificarse sustituyendo su región constante con una región constante de una inmunoglobulina humana que comprende una modificación como aquí se desvela. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede mantener su especificidad mientras tiene antigenicidad reducida y agregación reducida en general en comparación con el anticuerpo original de ratón o un anticuerpo quimérico sin la modificación como la aquí desvelada.

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que mantiene su reactividad de un anticuerpo no-humano mientras es menos inmunogénico en humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, manteniendo las regiones CDR no humanas y sustituyendo el resto de las partes del anticuerpo con sus equivalentes humanos (esto es, la región constante así como las partes marco de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol. 44:65-92, 1988; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; y Padlan, Molec. Immun. 31:169-217, 1994. Otros ejemplos de tecnología de ingeniería humana incluyen, aunque no se limitan a, tecnología Xoma desvelada en US 5.766.886.

Los términos “enlazador”, “unidad enlazadora” o “enlace” como aquí se usan se refieren a una porción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que de manera covalente une un anticuerpo a una porción de fármaco u otra molécula. Los enlazadores incluyen un radical divalente tal como alquildil, un arileno, un heteroarileno, porciones tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PeG, polimetileneoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietileneamino, Jeffamine.TM); y éster diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

El término “etiqueta” como aquí se usa se refiere a cualquier porción que puede unirse covalentemente con un anticuerpo y que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda etiqueta, por ejemplo, TERF (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar afinidad de enlace, con antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, o permeabilidad celular, mediante carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar una porción de fractura, para modular la afinidad de ligando, enlace anticuerpo/antígeno o formación de complejo iónico.

El término “humanizar” como aquí se usa se refiere a un método para convertir anticuerpos no humanos en anticuerpo humanos diseñados (Véase, por ejemplo, tecnología KaloBios Humaneering™).

Como aquí se usa, “isotipo” se refiere a cualquier clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG2) que proporciona la región constante de cadena pesada que tienen los motivos propensos a la agregación aquí desvelados (y por lo tanto están dispuestos a las modificaciones aquí desveladas para reducir la agregación).

Como aquí se usa, el término “afinidad” se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en sitios antigénicos sencillos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del “brazo” del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, la afinidad es más fuerte. Las modificaciones aquí desveladas preferentemente no reducen la afinidad de la inmunoglobulina o anticuerpos aquí desvelados o la afinidad se reduce menos del treinta por ciento, menos del veinte por ciento, menos del diez por ciento o menos del cinco por ciento. Como aquí se usa, cuando se determina si las modificaciones aquí descritas reducen la afinidad la comparación se hace entre la inmunoglobulina o anticuerpo con la modificación y la misma inmunoglobulina carente de la modificación pero que incluye cualquier mutación no relacionada.

Como aquí se usa, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano.

Los términos “animal no humano” incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Los términos “agente quimioterapéutico” como aquí se usa se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA™, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE™, Millenium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX™, Astrazeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozole (FEMARA™, Novartis), Mesilato de imatinib (GLEEVE™, Novartis), PKD787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatin (Eloxatin™, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracil), Leucovorin, Rapamicin (Sirolimus, RAPMUNE™, Wyeth), Lapatinib (GSK572016, GlaxoSmithKline), Lonaferin (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y Gefitinib (IRESSA™, Astrazeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y CITOXAN™ ciclofosfamida; sulfonato de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamenaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomenlamina; acetoinas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyenod el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocolesina, carcelesina y bicelesina), criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB 1-TM1); eleuterobina; pancreastatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tal como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalano, novenbicina, fenestirina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracil; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gam11 y calicheamicina omega11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-1866); dinemicina, incluyendo dinemicina A, bisfosfonatos, tale como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibiótico de enedina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, antramycin, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN™ doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dedeoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; acetaglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciquona; elfornitina; acetato de eliptino; epotilino; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiquina; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbina; PSK™ complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizozin; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbicina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel TAXOL™ (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y formulación de paclitaxel ABRAXANETM libre de cremoforo con nanopartículas diseñadas de albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y doxetaxel TAXOTERE™ (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR™; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y

carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE™; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilnolutina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición de “agentes quimioterapéutico”; (i) agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la aromatasas de enzima, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 5(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de magestrol MEGASE™, exemestano AROMASIN, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR™, letrozol FEMARA™ y anastrozol ARIMIDEX™; (iii) anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); (iv) inhibidores de aromatasas; (v) inhibidores de proteína quinasa; (vi) inhibidores de lípido quinasa; (viii) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; (viii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME™) y un inhibidor de la expresión de HER2; (ix) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN™, vacuna LEUVECTIN™ y vacuna VAXID™; rIL-2 PROLEUKIN™; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN™; rmRH ABARELIX™; (x) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN™, Genentech); y (xi) sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Como aquí se usa, el término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas de polipéptido tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas la hormona del crecimiento, tal como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionil y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimuladora del folículo (HEF), hormona estimuladora del tiroides (HET) y hormona leutinizante (HL), factor del crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblato; prolactina, lactógeno placentar; factor- α y $-\beta$ de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mulieria; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervio tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina $-I$ y $-II$; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferón tal como interferón $-\alpha$, $-\beta$ y $-\gamma$; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocito-macrófago (GM-CSF); y CSF de granulocito (G-CSF); interleuquinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; factores de necrosis tumoral tales como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptido que incluyen LIF y kit ligando (KL). Como aquí se usa, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Como aquí se usa, el término “optimizado” significa que una secuencia de nucleótido se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácido usando codones que son preferentes en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de Pichia, una célula de ovario de hámster chino (OHC) o una célula humana. La secuencia de nucleótido optimizada se diseña para retener por completo o lo máximo posible la secuencia de aminoácido originalmente codificada por la secuencia de nucleótido inicial, que es también conocida como secuencia “parental”. Aquí también se prevé la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucarióticas. Las secuencias de aminoácido codificadas por secuencias de nucleótido codificadas también son referidas como optimizadas.

Como aquí se usan, el término “actividad de enlace de antígeno” se refiere a la especificidad de enlace de una inmunoglobulina o conjugado de inmunoglobulina a su antígeno diana. Por ejemplo, la actividad de enlace de antígeno puede medirse mediante bioensayos con base celular (por ejemplo, ensayos de genes reporteros), ELISA, resonancia de plasmón de superficie (Biacore) o cualquier otra técnica conocida por un experto en la técnica.

Como aquí se usan, el término “propensión de enlace cruzado” (PEL) se refiere a la propensión de una inmunoglobulina o conjugado de inmunoglobulina modificada que contiene una mutación que es una sustitución con cisteína a enlace cruzado entre diferentes inmunoglobulinas en el residuo de cisteína sustituida. Por ejemplo, un PEL puede determinarse mediante el nivel de oligomerización como se mide mediante un SDS-PAGE no reducir, cromatografía con exclusión por tamaño, dispersión de luz láser dinámica o estática con cromatografía de exclusión por tamaño o cualquier otra técnica conocida por un experto en la técnica. La clase I comprende variantes que son monoméricas y permanecen estables después del etiquetado. Las variantes de clase II contienen un pequeño porcentaje de dímeros antes y después del etiquetado. Las variantes de clase III tienen una propensión más pronunciada a oligomerizarse incluyen la formación de algunos trímeros. Las variantes de clase IV tienen una propensión incluso más alta a oligomerizarse como lo demuestra la presencia de agregados mayores que los trímeros, especialmente después del etiquetado. La clase V incluye variantes de alta propensión a oligomerización

de manera similar a la variante de clase IV con anomalías estructurales adicionales tales como fragmentación o coloración de muestra concentrada purificada.

El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de enlazarse con un anticuerpo. Los epítipos normalmente consisten en grupos de moléculas con superficie químicamente activa tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga. Los epítipos de conformación y no conformación se distinguen en que el enlace a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Los términos "variante conservativamente modificada" se aplican a secuencias de aminoácido y ácido nucleico. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácido idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido, con secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición donde una alanina se especifica por un codón, el codón puede alterarse a cualquier de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Aquí cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón es un ácido nucleico (excepto AUG, que es generalmente el único codón para metionina, un TGG, que es generalmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para secuencias de polipéptido, las "variantes conservativamente modificadas" incluyen sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de polipéptido que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporciona aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos de inter-especies y alelos de la divulgación. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G), 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilamina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o sub-secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si las dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (esto es, 60% identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 88% identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre la secuencia completa), cuando se compara y se alinea para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferentemente sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para comparación secuencial, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de sub-secuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo secuencial. Pueden usarse los parámetros de programa estándares, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación secuencial puede después calcular las identidades secuenciales porcentuales para las secuencias de prueba en relación con las secuencias de referencia, en base a los parámetros del programa. Cuando se comparan dos secuencias para identidad, no es necesario que las secuencias sean contiguas, sino que cualquier hueco podría tener su penalización que reduciría la identidad porcentual total. Para blastn, los parámetros estándares son penalización por abertura de huecos=5 y penalización por extensión de huecos=2. Para blastp, los parámetros estándares son penalización por abertura de huecos=11 y penalización por extensión de huecos=1.

Una "ventana de comparación", como aquí se usa, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera de los números de posiciones contiguas incluyendo, aunque sin limitarse a, desde 20 a 600, normalmente desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente desde aproximadamente 100 a aproximadamente 150 donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado óptimamente. Los métodos para alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede conducirse, por ejemplo, mediante algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970,

mediante la búsqueda de método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementación computerizaa de estos algoritomso (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad secuencial porcentual y similitud secuencial son los algoritmos BLAST Y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids. Res. 25:3389-3402, 1977; y Altschul et al., J. Mol. Bil. 215:403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias con alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que pueden coincidir o satisfacer algún umbral con valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. T ser refiere al umbral de puntuación de palabra vecino (Altschul et al., supra). Estos golpes de palabra inicial vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Los golpes de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativo. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótido, los parámetros M (puntuación recompensa para un par de residuos que combinan; siempre > 0) y N (puntuación penalización para residuos que no combinan; siempre > 0). Para secuencias de aminoácido, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los golpes de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo cae por la cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa va a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo con puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BASTN (para secuencias de nucleótido) usa como estándares una longitud de palabra (W) de 22, una esperanza (E) de 20, M=5, N=-4 y una comparación de ambos aspectos. Para secuencias de aminoácido, el programa BLASTP usa como estándares una longitud de palabra de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (VEASE Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) alineamientos (B) de 50, esperanza € de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambos aspectos.

El algoritmo BLAST también puede realizar un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. ACad. Sic. USA 90:5873-5787, 1993). Una medición de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que ocurriría una combinación entre dos secuencias de nucleótido o aminoácido por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña es en comparación con el ácido nucleico de la prueba con el ácido nucleico de referencia inferior a aproximadamente 0,2, más preferentemente inferior a 0,01, y más preferentemente inferior a 0,001.

Además del porcentaje de identidad secuencial indicada anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas e que el polipéptido codificado por el primero ácido nucleico es inmunológicamente reactivo con los anticuerpos que se provocan contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más abajo. Así, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos polipéptidos difieren solamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridizan entre sí bajo condiciones severas, como se describe más abajo. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que pueden usarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

Los términos "operativamente unido" se refieren a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótido (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refieren a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está operativamente unida a una secuencia codificadora si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificadora en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están operativamente unidad a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, esto es, son cis-actantes. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o situadas en cercana proximidad con las secuencias codificadoras cuya transcripción potencian.

El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido con el cual se ha unido. Un tipo de vector es el "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular de doble hélice en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden ligarse al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de réplica autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tiene un origen bacteriano de réplica y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a quienes están unidos. Tales vectores aquí se refieren como "vectores de expresión recombinante" (o

5 simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo tienen forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse intercambiamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la divulgación no pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de réplica, adenovirus y virus asociados con adeno) que sirven funciones equivalentes.

10 Los términos "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refieren a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que tales términos pretenden referirse no solamente a la célula del sujeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, tal progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula madre, pero se sigue incluyendo en el alcance del término "célula huésped" como aquí se usa.

15 Los términos "antígeno diana" se refieren a antígeno contra el que se provoca la inmunoglobulina madre o se genera de otra manera (por ejemplo, mediante expresión en fago).

20 Los términos "inmunoglobulina no mutada" se refieren a la inmunoglobulina que no comprende al menos una mutación que es una sustitución con un residuo de cisteína. Como aquí se usa, la inmunoglobulina no mutada puede ser una construcción hipotética con el fin de comparar la propensión a oligomerización o la eficiencia de conjugación de la inmunoglobulina con y sin la mutación. A modo de ejemplo, un anticuerpo murino que incluye mutaciones humanizadas así como mutaciones a cisteína con el fin de conjugación no es la inmunoglobulina no mutada. La inmunoglobulina no mutada sería el anticuerpo con mutaciones humanizadas, pero sin las mutaciones a cisteína. Donde una mutación pretende servir para más de un fin incluyendo los sitios para conjugación, la inmunoglobulina no incluye tal mutación.

25 Los términos "motivo de agregación" se refieren a un conjunto de residuos agrupados juntos en base al siguiente proceso. Primero, se identifican residuos que tienen una PAE (radio 5Å) superior a 0,15. Después, se identifican todos los residuos en 5Å de cada residuo que tienen una PAE (radio 5Å) superior a 0,15. Es un motivo entonces el residuo con una PAE (radio 5Å) superior a 0,15 y todos los residuos con una PAE (radio 5Å) superior a 0,0 en 5Å del residuo con una PAE (radio 5Å) superior a 0,15. Tales motivos que tienen al menos un residuo en común se unen en un motivo más grande de manera reiterativa hasta que no quedan motivos que tengan un residuo en común. El resto de los motivos o conjuntos de residuos constituyen motivos de agregación.

30 Donde los residuos de inmunoglobulina son referidos por número aquí, el número del residuo se refiere al número Kabat del residuo correspondiente en la molécula IgG1 cuando la secuencia de inmunoglobulina de interés está alineada con la inmunoglobulina humana IgG1. A modo de referencia, los dominios constantes humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean:

40 **Dominio C_{H1}**

	..A..	loop	B....	loop..C...	C' loop..D.
	120	130	140	150	160
45	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF			
	IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF			
	IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF			
50	IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF			
	..	loop ...E.....	loop.	...F... loop ..G....	join
		180	190	200	210
55	IgG1	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC			
	IgG2	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCC			
	IgG4	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG			
60	IgG3	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEPKTP			
	(IgG1 = SEQ ID NO: 1; IgG2 = SEQ ID NO: 2; IgG4 = SEQ ID NO: 3; IgG3 = SEQ ID NO: 4)				

65 **Bisagra**

5

	superior	inferior medio
10		230
	IgG1 -DKTHT -----	CPPCP APELLGG (SEQ ID NO: 5)
15	IgG2 -VE--- -----	CPPCP AP-PVAG (SEQ ID NO: 6)
	IgG4 -PP--- -----	CPSCP APEFLGG (SEQ ID NO: 7)
	IgG3 LGTTHT CPRCPEPK*****	CPRCP APELLGG (SEQ ID NO: 8)
20	Dominio C _{H2}	
	..A.. loop B.... loop ..C.. C' loop ...D	
25	240 250 260 270 280 290	
	IgG1 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP	
30	IgG2 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP	
	IgG4 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP	
	IgG3 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP	
35	... loop E.... .loop. ...F.....loop ..G... joinC3	
	300 310 320 330 340	
40		
	IgG1 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	
	IgG2 REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE	
45	IgG4 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE	
	IgG3 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE	
	(IgG1 = SEQ ID NO: 9; IgG2 = SEQ ID NO: 10; IgG4 = SEQ ID NO: 11; IgG3 = SEQ ID NO: 12)	
50	Dominio C _{H3}	
	..A.. loop B.... loop ..C...C' loop..D....	
55	350 360 370 380 390 400	
60	IgG1 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS	
	IgG2 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS	
	IgG4 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS	
65	IgG3 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTPVLDS	

5 loopE... .loop. ...F... loopG....
 410 420 430 440
 | | | |
 10 IgG1 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 IgG2 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 IgG4 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
 IgG3 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMHEALHNHFTQKSLSLSPGK
 15 (IgG1 = SEQ ID NO: 13; IgG2 = SEQ ID NO: 14; IgG4 = SEQ ID NO: 15; IgG3 = SEQ ID NO:
 16)

20 Dominio C_L

		11	12	13	14	15	
		0123456789012345678901234567890123456789					
25	constante	•	KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK				
	constante	•	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWK				
30			16	17	18	19	
			0123456789012345678901234567890123456789				
	constante	•	ADSSPVKAGVETTTTPSKQS-NNKYAASSYLSLTPEQWKSH				
35	constante	•	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH				
40			20	21			
			01234567890123456789012345				
	constante	•	RSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 17)				
	constante	•	KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 18)				

45 Los alineamientos de V_H y V_L pueden encontrarse en Ewert, Honegger y Plüchthun, Methods 34 (2004) 184-199.

50 Conjugados de inmunoglobulina de la invención

55 La invención aquí se refiere a conjugados de inmunoglobulina que incluyen inmunoglobulinas que tienen al menos una mutación de un residuo de la superficie de la inmunoglobulina donde la mutación es una sustitución con un residuo de cisteína. El residuo de cisteína sustituido s conjuga con un átomo o molécula, que puede ser, a modo de ejemplo, una agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como una doxorubicina o toxina pertussis), un fluoróforo tal como un tinte fluorescente como fluoresceína o rodamina, una agente quelante para imagen o metal radioterapéutico, una etiqueta de peptidilo o no-peptidilo o etiqueta de detección, o un agente modificador de despeje tal como varios isómeros de polietilenglicol, un péptido que se enlaza con un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico. En más realizaciones, la molécula puede ser una enzima, un péptido, un péptido mimético, un nucleótido tal como molécula de ARN, incluyendo siARN, microARN y miméticos de ARN, o aptámeros.

60 Conjugados de inmunoglobulina etiquetados

65 En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas modificadas de la invención pueden conjugarse con cualquier porción de etiqueta que puede unirse covalentemente a la inmunoglobulina por medio de un grupo tio de cisteína reactivo (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Laundblad R. L. (1991)

Chemical Reagents for Protein Modification, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.). La etiqueta unida puede funcionar, por ejemplo, para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda etiquetas, por ejemplo, para dar TERF (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar la afinidad de enlace, con antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética o permeabilidad a células, mediante carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar una porción de captura, para modular afinidad de ligando, enlace anticuerpo/antígeno o complejación iónica.

Los conjugados de inmunoglobulina etiquetados puede ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específico. Para aplicaciones diagnósticas, la inmunoglobulina típicamente se etiquetará con una porción detectable. Hay disponibles numerosas etiquetas que pueden agruparse en las siguientes categorías ejemplares:

(a) Radioisótopos (radionúclidos) tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . Las inmunoglobulinas etiquetadas con radioisótopos son útiles en experimentos de imagen dirigidas a receptores. La inmunoglobulina puede etiquetarse con reactivos de ligandos que se enlazan, quelan o de otra manera forman complejos con un metal de radioisótopo donde el reactivo es reactivo con el tiol de cisteína diseñado de la inmunoglobulina, usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden formar un complejo con un ión metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclis, Dallas, Tex.). Los radionúclidos pueden dirigirse mediante complejación con los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención (Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Los complejos metal-quelato adecuados como etiquetas de inmunoglobulina para experimentos con imágenes se desvelan en: patentes de Estados Unidos Números 5.342.606; 5.428.155; 5.316.757; 5.480.990; 5.462.721; 5.428.139; 5.385.893; 5.739.294; 5.750.660; 5.843.456; Hanatowich et al. (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al. (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al. (1990) *J. Cancer* 1990, Supl. 10:21-26; Izard et al. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al. (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al. (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al. (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al. (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al. (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo et al. (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al. (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al. (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al. (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

(b) Etiquetas fluorescentes tales como quelatos de tierra rara (quelatos de europio), tipos de fluoresceína incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; tipos de rodamina incluyendo TAMRA; dansilo; lisamina; cianinas; ficoeritrinas; Texas Red; y análogos de los mismos. Las etiquetas fluorescentes pueden conjugarse con inmunoglobulina usando la técnicas desveladas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. Los tintes fluorescentes y los reactivos de etiqueta fluorescente incluyen aquellos disponibles en el mercado en Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, Org.) y Pierce Biotechnology, Inc., (Rockford, Ill):

(c) Varias etiquetas de sustrato de enzima están disponibles o se desvelan (Patente de Estados Unidos N° 4.275.149). La enzima generalmente cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse usando varias técnica. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede después emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un receptor fluorescente. Ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (PR), fosfatasa alcalina (FA), β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido (por ejemplo, oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas herocíclicas (tales como oxidasa de uricasa y xantina), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan et al. (1981) "Métodos para la preparación de conjugados enzima-anticuerpo para su uso en inmunoensayo de enzima" en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166.

Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: (i) Peroxidasa de rábano (PR) con peroxidasa de hidrógeno como un sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de tinte (por ejemplo, ortofenileno diamina (OD) o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina hidrocloreuro (TMB); (ii) fosfatasa alcalina (FA) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa. Están

disponibles otras numerosas combinaciones enzima-sustrato para aquellos expertos en la técnica. Para un análisis general, véase patente de Estados Unidos N° 4.275 y N° 4.318.980.

Una etiqueta puede estar indirectamente conjugada con inmunoglobulinas modificadas de la invención. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede estar conjugada con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas mencionadas anteriormente puede estar conjugada con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se enlaza selectivamente con estreptavidina y así, la etiqueta puede conjugarse con la inmunoglobulina de esta manera directa. Alternativamente, para conseguir una conjugación directa de la etiqueta con la variante de inmunoglobulina, la variante de inmunoglobulina se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de etiquetas mencionadas anteriormente se conjuga con una variante de polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Así, puede conseguirse la conjugación indirecta de la etiqueta con la variante de inmunoglobulina (Hermanson, G. (1996) en *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

Los conjugados de inmunoglobulina e inmunoglobulinas modificados de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de enlace competitivo, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158, CRC Press, Inc.).

Una etiqueta de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar un evento de enlace o reconocimiento. Los conjugados de inmunoglobulina etiquetados de la invención pueden detectar receptores de superficie de célula. Otro uso para conjugados de inmunoglobulina etiquetados de manera detectable es un método de inmunocaptura con base de gotas que comprende en conjugar una gota con un anticuerpo etiquetado fluorescente y detectar una señal de fluorescencia después de unirse a un ligando. Metodologías similares de detección de enlace utilizan el efecto de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir y detectar las interacciones anticuerpo-antígeno.

Las etiquetas de detección tales como los tintes fluorescentes y tintes quimioluminiscentes (Briggs et al (1997) "Síntesis de tintes fluorescentes funcionalizados y sus enlace con aminas y aminoácidos" *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058) proporcionan una señal detectable y son generalmente aplicables para etiquetar inmunoglobulinas, preferentemente con las siguientes propiedades: (i) la inmunoglobulina etiquetada debería producir una señal muy alta con fondo bajo para que cantidades pequeñas de inmunoglobulinas puedan detectarse sensiblemente en ensayos libres de células y basados en células; y (ii) el anticuerpo etiquetado debería ser fotoestable para que la señal fluorescente pueda observarse, controlarse y registrarse sin fotoblanqueo significativo. Para aplicaciones que incluyen enlace de la superficie de célula de anticuerpo etiquetado a membranas o superficie de célula, especialmente célula vivas, las etiquetas preferentemente (iii) tienen una buena solubilidad en agua para conseguir una concentración efectiva de conjugado y sensibilidad de detección y (iv) son no tóxicas para las células para no interrumpir los procesos metabólicos normales de las células o causar muerte prematura de células.

La cuantificación directa de intensidad de fluorescencia celular y enumeración de eventos etiquetados fluorescentemente, por ejemplo, enlace de superficie de célula de conjugados con tinte peptídico puede conducirse en un sistema (FMAT™ 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza, mezcla y lee ensayos no radioactivos con células o gotas vivas (Miraglia, "Ensayos homogéneos con base de célula o gotas para cribado de alto rendimiento usando tecnología de ensayo fluorométrico con microvolumen", (1991) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). Los usos de inmunoglobulinas etiquetados también incluyen ensayos de enlace de receptor de superficie de célula, ensayos de inmunocaptura, ensayos por inmunoabsorción ligado a fluorescencia (ELISA), división de caspasa (Zheng, "Caspasa-3 controla eventos citoplásmicos y nucleares asociados con apoptosis mediada por Fas in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23, patente de Estados Unidos N° 6.372.907), apoptosis (Vermes, "Un ensayo nuevo para apoptosis. Detección citométrica de flujo de expresión de fosfatidilserina en células apoptóticas tempranas usando Anexina V etiquetada con fluoresceína" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) y ensayos de citotoxicidad. Puede usarse la tecnología de ensayo fluorométrico con microvolumen para identificar la regulación creciente o decreciente por una molécula que está dirigida a la superficie celular (Swartzman, "Un inmunoensayo homogéneo y múltiple para cribado de alto rendimiento usando tecnología de ensayo fluorométrico con microvolumen", (1999), *Anal. Biochem.* 271:143-51).

Los conjugados de inmunoglobulina etiquetados de la invención son útiles como biomarcadores de imágenes y sondas por los varios métodos y técnicas de imágenes biomédicas y moleculares tales como (i) IRM (imagen por resonancia magnética); (ii) MicroTC (tomografía computarizada); (iii) TCEFU (tomografía computarizada por emisión de fotón único); (iv) TEP (tomografía por emisión de positrón) Chen et al. (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonido. La inmunoescintigrafía es un procedimiento con imágenes en el que los anticuerpos etiquetados con sustancias radioactivas se administran a un paciente animal o humano y se toma una fotografía de los sitios en el cuerpo donde se localiza el anticuerpo (patente de Estados Unidos N° 6.528.624). Los biomarcadores para imágenes pueden medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: Tipo 0 son marcadores de historia natural de una enfermedad y se correlacionan longitudinalmente con varios índices clínicos conocidos, por ejemplo, evaluación de IRM de inflamación sinovial en artritis reumatoide; marcadores de tipo 1 capturar el efecto de una intervención de

acuerdo con un mecanismo de acción, aunque el mecanismo puede no estar asociado con el resultado clínico; marcadores de tipo II funcionan como extremos sustitutos donde el cambio en, o la señal de, el biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta dirigida, tal como erosión ósea medida en artritis reumatoide por TC. Los biomarcadores para imágenes pueden así proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FD) sobre: (i) expresión de proteína diana, (ii) enlace de un elemento terapéutico con la proteína diana; esto es, selectividad, y (iii) datos farmacocinéticos de despeje y vida media. Las ventajas de biomarcadores para imágenes in vivo con respecto a biomarcadores con base de laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, evaluación cuantificable del cuerpo completo, dosificación y evaluación repetitiva, esto es, múltiples puntos en el tiempo, y efectos potencialmente transferibles de resultados pre-clínicos (animal pequeño) a clínicos (humano). Para algunas aplicaciones, las bioimágenes suplantán o minimizan el número de experimentos con animales en estudios pre-clínicos.

Las etiquetas para imágenes de radionúclidos incluyen radionúclidos tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . El ión metálico de radionúclido puede formar un complejo con un enlazador quelante tal como DOTA. Los reactivos enlazadores tales como DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA) puede prepararse mediante reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con isopropilclorofornato (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807). Los reactivos DOTA-maleimida reaccionan con los aminoácidos de cisteína libres de las inmunoglobulinas modificadas y proporcionan un ligando que forma complejo con metal en el anticuerpo (Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Los reactivos que etiquetan enlazador quelante tal como DOTA-NHS (1,4,7,10-tetrazaciclododécano-1,4,7-10-ácido tetraacético mono (N-hidroxisuccinimida éster) están disponibles en el mercado (Macrocyclics, Dallas, Tex.). Las imágenes dirigidas al receptor con anticuerpos etiquetados con radionúclidos pueden proporcionar un marcador o activación de ruta mediante la detección y cuantificación de acumulación progresiva de anticuerpos en tejido tumoral (Albert et al. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Los radio-metales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación liposomal.

Los métodos para etiquetado de péptidos son bien conocidos. Véase Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, inc., Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer et al. (1975) Chemical Modifications of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., Nueva York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I y II, CRC Press, Nueva York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin y Nueva York; y Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al. (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155; Lewis et al. (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237.

Los péptidos y proteínas etiquetados con dos porciones, un reportero fluorescente y un inhibidor fluorescente en suficiente proximidad sufren transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF). Los grupos reporteros son típicamente tintes fluorescentes que se excitan por luz en una cierta longitud de onda y transfieren energía a un receptor, un inhibidor, grupo con el apropiado desplazamiento Stokes para emisión en el máximo brillo. Los tintes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad extendida, tal como fluoresceína o rodamina, y sus derivados. El reportero fluorescente puede estar parcialmente o significativamente inhibido por la porción inhibidora en un péptido intacto. Después de la división del péptido por una péptidasa o proteasa, puede medirse un aumento detectable en fluorescencia (Knight, C. (1995) "Ensayos Fluorométricos de Enzimas Proteolíticas", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34.

Los anticuerpos etiquetados de la invención también pueden usarse como agente de purificación de afinidad. En este proceso, el anticuerpo etiquetado se inmoviliza sobre una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado entra en contacto con una muestra que contiene el antígeno que se purificará, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el antígeno que se purificará, que está unido a la variante de polipéptido inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante de polipéptido.

Los reactivos de etiquetado típicamente contienen funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de una inmunoglobulina modificada para formar el anticuerpo etiquetado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un intermediario con etiqueta de enlazador o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar el anticuerpo etiquetado. La funcionalidad reactiva de reactivos de etiquetado incluyen: maleimida, haloacetilo, iodoacetamida succinimidil éster (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriacínilo, pentafluorofenil éster y fosforamidita, aunque también pueden usarse otros grupos funcionales.

Un grupo reactivo funcional ejemplar es N-hidroxisuccinimidil éster (NHS) de un grupo carboxilo sustituyente de una etiqueta detectable, por ejemplo, biotina o un tinte fluorescente. El éster NHS de la etiqueta

puede pre-formarse, aislar, purificarse y/o caracterizarse o puede formarse in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Típicamente, la forma de carboxilo de la etiqueta se activa haciendo reaccionar con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o un reactivo de uranio, por ejemplo, TSTU (O—(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato) o HATU (O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato), un activador, tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), y N-hidroxisuccinimida para dar el éster NHS de la etiqueta. En algunos casos, la etiqueta y el anticuerpo pueden estar unido por activación in situ de la etiqueta y reacción con el anticuerpo para formar el conjugado etiqueta-anticuerpo en una etapa. Otros reactivos de activación y unión incluyen TBTU (2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametiluronio 2-fluoro-hexafluorofosfato), PyBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirridilidion-fosfonio hexafluorofosfato), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidro-quinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitileno-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol y haluros de aril sulfonyl, por ejemplo, cloruro de triisopropilbencenosulfonyl).

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar usos de los conjugados de inmunoglobulina de la invención como una herramienta de diagnóstico.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar usos de los conjugados de inmunoglobulina de la invención como un estándar para proteínas de alto peso molecular.

Conjugados de polímero de inmunoglobulina

En realizaciones adicionales, la presente invención también contempla conjugados de inmunoglobulina, en los que la inmunoglobulina está unida a un polímero. Típicamente, el polímero es soluble en agua de manera que un componente de inmunoglobulina no precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es aquel que se ha modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De esta manera, el grado de polimerización puede controlarse. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilenglicol propionaldehído, o mono-(C₁-C₁₀) alcoxi o derivados ariloxi de los mismos (véase, por ejemplo, Harris, et al. Patente de Estados Unidos N° 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Además, puede usarse una mezcla de polímeros para producir conjugados con componentes de anticuerpo.

Polímeros solubles en agua adecuados incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-(C₁-C₁₀) alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un co-polímero óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol de polivinilo, dextrano, celulosa u otros polímeros con base de carbohidrato. PEG adecuados pueden tener un peso molecular de desde aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua.

Como una ilustración, una porción de óxido de polialquilo puede unirse a la terminal N de un componente de inmunoglobulina. PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Por ejemplo, una inmunoglobulina puede modificarse con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación de una inmunoglobulina puede realizarse mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, EP 0 154 316, Delgado et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249 (1992) Duncan y Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27:290 (1994) y Francis et al., Int. J. Hematol 68:1 (1998)). Por ejemplo, puede realizarse PEGilación mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En una técnica alternativa, los conjugados de inmunoglobulina se forman condensando PEG activado, en el que un hidroxilo terminal o un grupo amino de PEG se ha sustituido por un enlazador activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz et al., patente de Estados Unidos N° 5.382.657).

La PEGilación mediante acilación típicamente requiere hacer reaccionar un éster activo derivado de PEG con una inmunoglobulina. Un ejemplo de un éster PEG activado es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida. Como aquí se usa, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de uniones entre una inmunoglobulina y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los métodos para preparar inmunoglobulinas PEGiladas anti-BCMA-TACI mediante acilación típicamente comprenden las etapas de (a) hacer reaccionar una inmunoglobulina con PEG (tal como éster reactivo de un aldehído derivado de PEG) abajo condiciones mediante las cuales uno o más grupos PEG se unen a la inmunoglobulina, y (b) obtener el producto o productos de la reacción. Generalmente, las reacciones óptimas de reacción para reacciones de acilación se determinarán en base a parámetros conocidos y resultados deseados. Por ejemplo, cuando mayor sea la proporción de PEG:componente de anticuerpo, mayor será el porcentaje de producto de componente de anticuerpo poliPEGilado.

El producto de PEGilación mediante acilación es típicamente un producto de inmunoglobulina PEGilado, donde los grupos de lisina ε-amino son PEGilados mediante un grupo de unión de acilo. Un ejemplo de una unión enlazadora es una amida. Típicamente, el componente resultante de inmunoglobulina estará al menos 95% mono-, di- o tri-pegilado, aunque puede formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación dependiendo de las condiciones de reacción. Las especies PEGiladas pueden separarse de componentes de inmunoglobulina no

conjugados usando métodos estándares de purificación, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

5 La PEGilación mediante alquilación generalmente incluye la reacción de un aldehído terminal derivado de PEG con un componente de inmunoglobulina en presencia de un agente reductor. Los grupos PEG puede estar unidos al polipéptido por medio un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}$.

10 La derivatización por medio de alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado tiene la ventaja de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para derivatización. Típicamente, la reacción se realiza en un pH que permite tomar ventaja de las diferencia Pka entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del residuo de terminal N de la proteína. Mediante esta derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, con una proteína. La conjugación con el polímero ocurre predominantemente en la terminal N de la proteína sin modificación significativa de otros grupos reactivos tales como los grupos amino de cadena secundaria de lisina.

15 La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de molécula conjugada de componente de anticuerpo monopolímero puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un componente de anticuerpo con PEG bajo condiciones reductoras de alquilación en un Ph adecuado para permitir modificación selectiva del grupo α -amino en la terminal amino del componente de anticuerpo, y (b) obtener el producto o productos de la reacción. El agente reductor usado para alquilación reductora debería ser estable en solución acuosa y preferentemente capaz de reducir solamente la base Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores preferente incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamina borano, trimetilamina borano y piridina borano.

20 Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de inmunoglobulina de monopolímero, las reacciones de reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva de la porción de polímero soluble en agua con la terminal N de la inmunoglobulina. Tales condiciones de reacción generalmente proporcionan las diferencias pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo α -amino en la terminal N. El pH también afecta a la proporción de polímero y proteína que se usará. En general, si el pH es inferior, se deseará un exceso mayor de polímero y proteína porque cuanto menos reactivo sea el grupo α -amino de terminal N, más polímero se necesitará para conseguir condiciones óptimas. Si el pH es mayor, el componente polímero:anticuerpo no necesita ser grande porque hay disponible más grupos reactivos. Típicamente, el pH estará en el rango de 3 a 9, o 3 a 6.

25 Los métodos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y porciones de polímero soluble en agua son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Karasiewicz et al., patente de Estados Unidos N° 5.382.657, Greenwald et al., patente de Estados Unidos N° 5.738.846, Nieforth et al., Clin. Pharmacol. Ther. 59:636(1996), Monkarsh et al., Anal Biochem. 247:434 (1997)).

40 Conjugados de fármaco de inmunoglobulina

En realizaciones adicionales, la presente invención incluye conjugados de inmunoglobulina en los que una inmunoglobulina se conjuga con un fármaco o porción citotóxica. La porción de fármaco de los conjugados de fármaco de inmunoglobulina pueden incluir, por ejemplo, cualquier compuesto, porción o grupo que tenga un efecto citotóxico o citoestático. Las porciones de fármaco incluyen, sin limitación: (i) agentes quimioterapéuticos, que pueden funcionar como inhibidores de microtubulina, inhibidores de mitosis, inhibidores de topoisomerasa, o intercaladores de ADN; (ii) toxinas de proteína, que pueden funcionar enzimáticamente; y (iii) radioisótopos.

50 Porciones de fármaco ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, una maitansinoide, una auristatina, una dolastatina, un tricoteceno, CC1065, una calicheamicina y otros antibióticos de enedina, una antraciclina y estereoisómeros, iso-ésteres, análogos o derivados de los mismos.

Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como porciones de fármaco de maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos y producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA) 99:7968-7073), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

60 Porciones de maitansinoide ejemplares incluyen aquellas que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C-19-decloro (patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparada mediante reducción de hidruro de aluminio de litio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-demetil) +/- C-19-decloro (patente de Estados Unidos Números 4.361.650 y 4.307.016) (preparada mediante demetilación usando Streptomyces o Actinomyces o declorinación usando LAH); y C-20-demetoxi, C-20-aciloxi ($-\text{OR}$), +/-decloro (patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparada mediante acilación usando cloruros de acilo) y aquellas que tienen modificaciones en otras posiciones.

65

Porciones de fármaco maitansinoide ejemplares también incluyen aquellas que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (patente de Estados Unidos N° 4.424.219) (preparada mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetil(demotoxi/CH₂OR) (patente de Estados Unidos N° 4.331.598); C-14-hidroximetil o aciloximetil) (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparada a partir de Nocard); C-I 5-hidroxi/aciloxi (patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparada a partir de la conversión de maitansinol por *Streptomyces*), C-15-metoxi (patente de Estados Unidos Números 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-demetil (patente de Estados Unidos Números 4.362.663 y 4.322.348) (preparada mediante la demetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-deoxi (patente de Estados Unidos N° 4.371.533) (preparada mediante la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol). Se conoce que muchas posiciones en los compuestos de maitansina son útiles como posición de unión, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, para formar una unión éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-10 que tiene un grupo hidroxilo son todas adecuadas.

Los compuestos de maitansina inhiben la proliferación celular la inhibir la formación de microtúbulos durante mitosis a través de la inhibición de polimerización de la proteína microtubulina, tubulina (Remillard et al. (1975) *Science* 189:1002-1005). Maitansina y maitansinoides son muy citotóxicos pero su uso clínico en terapia de cáncer ha estado muy limitado por sus severos efectos secundarios sistémicos principalmente atribuidos a su pobre selectividad para tumores. Los ensayos clínicos con maitansina no han continuado debido a los serios efectos adversos en el sistema nervioso central y sistema gastrointestinal (Issel et al. (1978) *Can. Treatment. Rev.* 5:199-207).

Las porciones de fármaco de maitansinoide son porciones atractivas de fármaco en conjugados de fármaco de inmunoglobulina porque son: (i) relativamente accesible para preparar mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) dispuestas a derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de enlaces no-disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) efectivas contra una variedad de líneas celulares tumorales (US 2005/0169933; WO 2005/037992; patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Como con otras porciones de fármaco, se contemplan todos los estereoisómeros de la fracción de fármaco de maitansinoide para los conjugados de la invención.

La fracción de fármaco de los conjugados de fármaco de inmunoglobulina también incluyen dolastatinas y sus análogos peptídicos y derivados, las auristatinas (patente de Estados Unidos Números 5.635.483; 5.780.588). Las dolastatinas y auristatinas han demostrado interferir con dinámicas de microtúbulos, hidrólisis GTP y división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anti-cáncer (patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y anti-hongos (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Varias formas de una porción de fármaco de dolastatina o auristatina pueden estar covalentemente unidas a un anticuerpo a través de la terminal N (amino) o C (carboxilo) de la porción de fármaco peptídico (WO 02/088172; Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) *Blood* 102(4):1458-1465).

Realizaciones ejemplares de auristatina incluyen porciones de fármaco de monometilauristatina unidas a terminal N DE y DF, desveladas en: WO 2005/081700; Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Reseña número 623, presentado Mar. 28, 2004.

Típicamente, las porciones de fármaco con base peptídica pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder y K. Luebke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de química peptídica.

La porción de fármaco incluye calicheamicina, y análogos o derivados de la misma. La familia calicheamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN de doble hélice en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, véase patentes de Estados Unidos Números: 5.712.374; 5.714.586; 5.739.116; 5.767.285; 5.770.710; 5.773.001; 5.877.296. Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, aunque no se limitan a: γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman et al *Cancer Research* 53:336-3342 (1993), Lode et al *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)).

Las toxinas de proteína incluyen, por ejemplo, cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina (Vitetta et al. (1987) *Science*, 238:1098), cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleuritis fordii*, proteínas de dianthin, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria oficinales, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos (WO 93/21232).

Los radioisótopos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ³²P, ³³P, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³¹In, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹²Pb e isótopos radioactivos de Lu.

El radioisótopo y otras etiquetas pueden incorporarse en el conjugado en modos conocidos (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989). El ácido 1-isotiocianotobencil-3-metildietileno triaminopentaacético con etiqueta carbon-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de un radionúclido con el anticuerpo (WO 94/11026).

Enlazadores

En ciertas realizaciones de la presente invención, el conjugado de inmunoglobulina incluye una molécula enlazadora que tiene al menos dos sitios reactivos. Un sitio reactivo está unido al residuo de cisteína sustituido de la inmunoglobulina, y el otro sitio reactivo está unido a un átomo o molécula. Un "enlazador" es una porción bifuncional o multifuncional que puede usarse para unir una o más porciones de fármaco y una unidad de inmunoglobulina para formar conjugados de inmunoglobulina. Los conjugados de inmunoglobulina pueden prepararse convenientemente usando un enlazador que tenga funcionalidad reactiva para unirse al fármaco u otra molécula y con la inmunoglobulina. Un tiol de cisteína de una inmunoglobulina modificada con una sustitución para cisteína puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo enlazador, una fracción de fármaco o un intermediario de fármaco-enlazador.

En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrofílico que es reactivo para una cisteína nucleofílica presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrofílico en un enlazador y forma un enlace covalente para un enlazador. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, aunque no se limitan a, grupos de maleimida y haloacetamida.

Las inmunoglobulinas modificadas de la invención reaccionan con reactivos enlazadores o intermediarios fármaco-enlazador, con grupos funcionales electrofílicos tales como maleimida o α -halo carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

El enlazador puede comprender residuos de aminoácido. La unidad de aminoácido, cuando está presente, une la inmunoglobulina con la porción de fármaco de los conjugados de fármaco de inmunoglobulina de la invención.

El enlazador de aminoácido puede ser, por ejemplo, una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los residuos de aminoácido que comprenden la unidad de aminoácido incluyen aquellos que ocurren de manera natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que ocurren de manera no natural, tal como citrulina.

La unidad de aminoácido puede dividirse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada con tumor, para liberar la porción de fármaco.

En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para unión covalente de más de una porción de fármaco a través de una fracción de enlazador multifuncional con ramas con un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la proporción molar de fármaco y anticuerpo, esto es, carga, que se relaciona con la potencia del conjugado de fármaco de inmunoglobulina. Así, cuando una inmunoglobulina modificada contiene solamente un grupo tiol de cisteína reactiva, una multitud de porciones de fármaco pueden unirse a través de un enlazador dendrítico.

En otra realización, el enlazador puede estar sustituido con grupos que modularon la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargada tal como sulfonato ($-\text{SO}_3$) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de unión del reactivo enlazador con la inmunoglobulina de la porción de fármaco, o facilitar la reacción de unión del intermediario inmunoglobulina-enlazador con la porción de fármaco, o el intermediario fármaco-enlazador con la inmunoglobulina, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el conjugado de inmunoglobulina.

Los compuestos de la invención expresamente contemplan, aunque no están limitados a, conjugados de inmunoglobulina preparados con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) e incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDb, BMH, BMOE, BM(PEO)₃ y BM(PEO)₄, que están disponibles en el mercado en Pierce Biotechnology, Inc., Departamento de Atención al Cliente, Apartado de correos 117, Rockford, ILL. 61105 U.S.A 1-800-874-3723, Internacional +815-968-0747. Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de una cisteína con una porción de fármaco que contiene tiol, o intermediario enlazador de una manera secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de una cisteína, porción de fármaco, etiqueta o intermediario enlazador incluyen, aunque sin limitación, iodocetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, piridil disulfuro, isocianato e isotiocianato.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar conjugados de inmunoglobulina que comprendan una inmunoglobulina que tenga al menos una mutación en el residuo 20 (V_L), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula está conjugado con el residuo de cisteína. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina se selecciona del grupo consistente de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende IgG1. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H1}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H2}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H3}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano C_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano V_H. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende un dominio humano V_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende además una molécula enlazadora que tiene al menos dos sitios reactivos, donde un primer sitio reactivo está unido al residuo de cisteína de la inmunoglobulina y un segundo sitio reactivo está unido al átomo o molécula. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes que tienen una molécula enlazadora, la molécula enlazadora se selecciona del grupo consistente en una hidrazona, un disulfuro, un péptido, un agente quelante y una maleimida. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula se selecciona del grupo consistente en un radionúclido, un agente quimioterapéutico, una toxina microbiana, una toxina de planta, un polímero, un carbohidrato, una citoquina, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta enzima-sustrato, una enzima, un péptido, un péptido mimético, un nucleótido, un siARN, un microARN, un ARN mimético y un aptámero. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula se selecciona del grupo consistente en ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹⁷⁷Lu, ²¹³Bi, ²¹¹At, una calicheamicina, una duocarmicina, un maitansinoide, una auristatina, una antraciclina, exotoxina A Pseudomona, toxina de Difteria, ricina, polietilenglicol, almidón de hidroxietilo y un residuo de manósil. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula reduce la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el átomo o molécula aumenta la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina puede además comprender una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Espor lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar inmunoglobulinaa modificadas o aisladas que comprende al menos una mutación en el residuo 20(V_L), donde al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un IgG1. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano C_{H1}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano C_{H2}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano C_{H3}. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano C_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano V_H. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina modificada o aislada comprende un dominio humano V_L. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende además una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Preparación de conjugados de fármaco de inmunoglobulina

En un aspecto, la presente invención incluye métodos para producir conjugados de inmunoglobulina. El conjugado de fármaco de inmunoglobulina puede prepararse mediante variar rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por aquellos en la técnica, que incluyen: (1) reacción de un grupo de cisteína de una inmunoglobulina modificada o aislad con un reactivo enlazador, para formar un intermediario inmunoglobulina-enlazador, por medio de un enlace covalente, seguido de reacción con una porción de fármaco activado; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de una porción de fármaco con un reactivo enlazador, para formar un intermediario fármaco-enlazador, por medio de un enlace covalente, seguido de reacción con un grupo de cisteína de una inmunoglobulina modificada. Los métodos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una

variedad de inmunoglobulinas modificadas, porciones de fármaco, y enlazadores para preparar los conjugados de fármaco de inmunoglobulina de la invención.

Los grupos tiol de cisteína de anticuerpo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupo electrofílicos en reactivos enlazadores e intermediarios fármaco-enlazador que incluyen: (1) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo; tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos de maleimida; y (iv) disulfuros, incluyendo piridil disulfuros, por medio de intercambio de sulfuro. Los grupos nucleofílicos en una porción de fármaco incluyen, aunque sin limitar: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, hidracina carboxilato y grupos de arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en porciones enlazadoras y reactivos enlazadores.

La maitansina, por ejemplo, puede convertirse en May-SSCH₃, que puede reducirse al tiol libre, May-SH, y reaccionar con un anticuerpo modificado (Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131) para generar un inmunconjugado maitansinoide-anticuerpo con un enlazador de disulfuro. Se han presentado conjugados anticuerpo-maitansinoide con enlazadores de disulfuro (WO 04/016801; Patente de Estados Unidos N° 6.884.874; US 2004/039176 A1; WO 03/068144; US 2004/001838; Patentes de Estados Unidos Números 6.441.163, 5.208.020, 5.416.064; WO 01/024763). El enlazador de disulfuro SPP se construye con el reactivo enlazador N-succinimidil 4-(2-piridiltilio)pentanoato.

Bajo ciertas condiciones, las inmunoglobulinas modificadas pueden hacerse reactivas para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitolo) o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina hidrocloreuro; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, Mass.) u otros agentes reductores conocidos por aquel experto en la técnica.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos para producir conjugados de inmunoglobulina proporcionando inmunoglobulinas modificadas o aisladas de acuerdo con la invención y todas las combinaciones de sus realizaciones, reduciendo uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos e incubando la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactivo con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina.

Propensión a agregación espacial

En un aspecto, la invención aquí se refiere a métodos para reducir en enlace cruzado de una inmunoglobulina o conjugado de inmunoglobulina. La invención puede aplicarse para generar inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina con propensión reducida a enlace cruzado, esto es, la inmunoglobulina o conjugado de inmunoglobulina en solución concentrada permanece principalmente en forma monomérica en lugar de multímeros agregados de mayor orden. Los métodos aquí representan un avance en la habilidad de métodos computacionales para evaluar la propensión de una proteína a enlace cruzado. En particular, los métodos se basan, al menos en parte, en el cálculo de AAD (Área Accesible al Disolvente), que es conocida en la técnica por caracterizar la superficie de una proteína. AAD da el área superficial de cada estructura de aminoácido o proteína que está en contacto con el disolvente. AAD puede calcularse típicamente computando el lugar del centro de una esfera de sonda cuando rueda sobre la superficie de la proteína, esto es, la superficie de un modelo estructural de proteína. La esfera de la sonda tiene el mismo radio que una molécula de agua, R=1,4Å. En la técnica se conocen métodos alternativos para calcular AAD, descritos más abajo, y son compatibles con los métodos aquí descritos. Aunque AAD es bastante útil para caracterizar la superficie de la proteína, no resultó ser adecuada para caracterizar las zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína que son propensos a agregación debido a las siguientes limitaciones:

1. AAD no distingue entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas
2. AAD no es directamente proporcional a la hidrofobicidad de un residuo (por ejemplo, MET tiene más área superficial que LEU pero es menos hidrofóbico)
3. AAD no indica si varios residuos hidrofóbicos están cerca y así podrían aumentar la hidrofobicidad de una cierta región. Estos residuos podrían estar cerca en una secuencia primaria o en la estructura terciaria aunque están mucho más en la secuencia primaria. De cualquier manera, podrían aumentar la hidrofobicidad de una cierta zona en la superficie del anticuerpo.

Una medición que aquí se describe, Efectivo-AAD, se general al calcular la hidrofobicidad de la fracción del aminoácido que se expone de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Efectivo-AAD} = \frac{\text{AAD}}{\text{AAD totalmente expuesta}} \times \text{hidrofobicidad de residuo}$$

- 5 Una realización más de Efectivo-AAD comprende sumar el Efectivo-AAD sobre al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.) residuos de aminoácido que están adyacentes en la secuencia de proteína primaria. Aunque el Efectivo-AAD representa una mejora con respecto al AAD básica, carece sin embargo de la habilidad para representar de manera completa la estructura de la proteína doblada y por el hecho de que los aminoácidos que no están adyacentes en la secuencia
- 10 de proteína pueden estar en proximidad entre sí en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria doblada de una proteína. Tales pliegues de la proteína pueden formar regiones propensas a la agregación que no aparecen en la estructura primaria sola, o que solamente pueden detectarse analizando más sólidamente la estructura de proteína doblada.
- 15 La divulgación describe una medida nueva más avanzada, llamada Espacio-Agregación-Propensión, que subrayará la hidrofobicidad efectiva de una cierta zona o región sobre la superficie de la proteína. Propensión a agregación espacial se calcula para regiones espaciales definidas en o cerca de átomos de un modelo estructural de proteína.
- 20 En este contexto, una "región espacial definida" es un espacio o volumen tridimensional elegido para capturar una estructura física y/o medio químico en o cerca de la estructura de la proteína. En una realización particular la propensión a agregación espacial se calcula para regiones esféricas con un radio R centrado en átomos de una proteína (por ejemplo, átomos en un modelo estructural de proteína). La propensión a agregación espacial también puede calcularse para regiones esféricas con radio R centrado en enlaces químicos, o colocado en un
- 25 espacio cercano al modelo estructural. Por consiguiente, en otra realización la PAE puede calcularse para una región espacial definida centrada cerca de un átomo, por ejemplo, centrada en un punto en el espacio que está entre 1-10 Å, 1-5 Å o 1-2 Å desde el centro de un átomo o enlace químico particular.
- 30 En ciertas realizaciones, el radio R elegido es entre 1 Å y 50 Å. En realizaciones particulares, el radio elegido es al menos 1 Å, al menos 3 Å, al menos 4 Å, al menos 5 Å, al menos 6 Å, al menos 7 Å, al menos 8 Å, al menos 9 Å, al menos 10 Å, al menos 11 Å, al menos 12 Å, al menos 15 Å, al menos 20 Å, al menos 25 Å, o al menos 30 Å. En ciertas realizaciones, el radio elegido es entre 5 Å y 15 Å, entre 5 Å y 12 Å o entre 5 Å y 10 Å. En realizaciones específicas, el radio elegido es 5 Å o 10 Å.
- 35 En otras realizaciones, la región para la que la propensión a agregación espacial se calcula no es esférica. La forma posible de la región puede además comprender un cubo, un cilindro, un cono, un esferoide elíptico, una pirámide, un hemisferio o cualquier otra forma que pueda usarse para encerrar una porción en un espacio. En tales realizaciones, el tamaño de la región puede elegirse usando mediciones diferentes al radio, por ejemplo, la distancia desde el centro de la forma a una cara o vértice.
- 40 En una cierta realización, la PAE puede usarse para seleccionar residuos en una proteína, particularmente un anticuerpo o inmunoglobulina, que puede sustituirse con cisteína sin aumentar la propensión de la proteína a enlace cruzado. Se espera que la presente divulgación reestructure el proceso de identificar residuos que pueden sustituirse con cisteína sin aumentar la propensión a enlace cruzado.
- 45 Así, en términos generales, un método para calcular la propensión a agregación espacial para un átomo particular en una proteína comprende (a) identificar uno o más átomos en un modelo estructural que representa la proteína, donde uno o más átomos están dentro de una región espacial definida centrada en o cerca del átomo particular; (b) calcular, para cada uno de los átomos en la región espacial definida, una proporción del área accesible
- 50 al disolvente (AAD) de los átomos con el AAD de átomos en un residuo idéntico que está completamente expuesto; (c) multiplicar cada proporción por la hidrofobicidad del átomo de uno o más átomos; y (d) sumar los productos de la etapa (c); por lo que la suma es el AAD para el átomo particular.
- 55 En una realización relacionada, la PAE puede calcularse de acuerdo con un método diferente que comprende (a) identificar uno o más residuos de aminoácido en un modelo estructural que representa la proteína, donde uno o más residuos de aminoácido tienen al menos un átomo dentro de una región espacial definida centrada en o cerca del átomo particular; (b) calcular, para cada uno de los residuos de aminoácido identificados, una proporción del área accesible al disolvente (AAD) de los átomos en el aminoácido con el AAD de átomos en un residuo idéntico que está completamente expuesto; (c) multiplicar cada proporción por la hidrofobicidad de uno o más residuos de aminoácido como lo determina una escala de hidrofobicidad de aminoácido; y (d) sumar los productos de la etapa (c); por lo que la suma es el AAD para el átomo particular. En realizaciones preferente, el modelo estructural se procesa antes de la etapa (a) permitiendo que el modelo estructural interactúe con el disolvente en una simulación de dinámica molecular. Cuando se identifica un aminoácido que tiene al menos un átomo dentro de la región espacial definida, puede requerirse que al menos ese átomo sea exclusivamente un átomo
- 60 en una cadena secundaria de aminoácido. Alternativamente, puede requerirse que el átomo sea un átomo de cadena principal.
- 65

En otras realizaciones, este método comprende además opcionalmente conducir una simulación de dinámica molecular antes de la etapa (a) y repetir las etapas (a)-(d), conduciendo cada vez una simulación adicional de dinámica molecular en una pluralidad de etapas en el tiempo, produciendo así múltiples sumas en la etapa (d), y calculando la media de las sumas; por lo que la media calculada es la PAE para el átomo particular.

Un experto en la técnica apreciará que una realización de la presente divulgación que emplea la media de valores calculados sobre una simulación de dinámica molecular será más intensiva computacionalmente. Tal realización también proporcionará, en algunos casos, un mapa más preciso o más resuelto del Espacio-Agregación-Propensión. Sin embargo, los experimentos aquí analizados han demostrado que el método es aún más preciso cuando no se emplea la media de la dinámica molecular, en una realización preferente, los valores de propensión a agregación espacial puede calcularse para todas las estructuras de proteínas en una base de datos, por ejemplo, el Banco de Datos de Proteínas (BDP), identificando de este modo rápidamente los residuos y las zonas hidrofóbicas en todas las estructuras conocidas de las proteínas. Este método permite un cribado rápido de grandes conjuntos de proteínas para identificar las regiones potenciales propensas a agregación y/o sitios de interacción de proteínas.

En una solicitud preferente, la propensión a agregación espacial se describe mediante la siguiente fórmula:

$$PAE_{\text{átomo}} = \Sigma_{\text{Media simulación}} (\Sigma_{\text{átomos en R de átomo}} ((AAD-R/AAD-fe) * \text{átomo-hb}))$$

donde:

1) AAD-R es AAD de átomos de cadena secundaria con radio R que se calcula en cada imagen de la simulación. AAD se calcula preferentemente en el modelo de simulación calculando el lugar del centro de una esfera de sonda cuando rueda sobre la superficie de la proteína. La esfera de sonda tiene el mismo radio que el de una molécula de agua, $R=1,4\text{\AA}$. Un experto en la técnica apreciará que otros métodos de calcular AAD serían compatibles con los métodos aquí descritos para calcular PAE. Por ejemplo, el AAD puede calcularse solamente en átomos de cadena secundaria de aminoácido. El AAD también puede calcularse solamente en átomos de cadena principal de aminoácido (esto es, aquellos átomos del eje peptídico e hidrógenos asociados). Alternativamente, el AAD puede calcularse solamente en átomos de cadena principal de aminoácido con la exclusión de hidrógenos asociados;

2) AAD-fe es AA de cadena secundaria de residuo completamente expuesto (dicho para aminoácido "X") que se obtiene, en una realización preferente, calculando el AAD de cadenas secundarias del residuo medio en la conformación completamente extendida de tripéptido "Ala-X-Ala"; y

3) átomo-hb es hidrofobicidad de átomo que se obtiene como se ha descrito anteriormente usando la escala de hidrofobicidad de Black y Mould (Black y Mould, Anal. Biochem. 1991, 193, 72-82). La escala se normaliza de manera que Glicina tenga una hidrofobicidad de cero. Por lo tanto, los aminoácidos que son más hidrofóbicos que Glicina son positivos y menos hidrofóbicos que Glicina son negativos en la escala hidrofóbica.

Un residuo que está "completamente expuesto" es un residuo, X, en la conformación completamente extendida del tripéptido Ala-X-Ala. Un experto en la técnica apreciará que esta disposición está diseñada de tal manera que un cálculo de AAD en tal residuo, X, producirá la máxima área accesible al disolvente disponible. Por consiguiente, se contempla el uso de otros residuos además de alanina en el cálculo sin interrumpir o alterar totalmente los resultados.

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de la presente divulgación pueden aplicarse a cualquier modelo estructural de proteína incluyendo una estructura de rayos X que use la misma fórmula anterior.

Similarmente, si la estructura de rayos X no está disponible, el mismo parámetro Propensión a Agregación Espacial puede aplicarse a la estructura generada a través del diseño gráfico de homología, y el parámetro PAE puede calcularse usando la misma fórmula anterior.

En ciertas realizaciones, la propensión a agregación espacial se calcula para todos los átomos en un modelo estructural de proteína. En algunas realizaciones, los valores atomísticos de propensión a agregación espacial pueden promediarse sobre cada residuo individual de proteína, o sobre grupos pequeños de residuos.

Usos de la metodología PAE

En un aspecto, la presente divulgación puede usarse como se ha descrito anteriormente para identificar residuos, regiones o zonas hidrofóbicas de aminoácido en una proteína. Sin querer apoyarse en valores específicos de umbral, los átomos o residuos de aminoácido que tienen una propensión a agregación espacial > 0 se consideran que son hidrofóbicos, o que están en una región propensa a agregación. Dependiendo del tipo de proteína, la estructura particular y el disolvente en el que existe, puede ser deseable identificar átomos o residuos usando un

límite que es ligeramente inferior a cero, por ejemplo, eligiendo átomos o residuos que tienen una Propensión de agregación espacial superior a -0,1, -0,15, -0,2, etc. Alternativamente, puede ser deseable emplear un límite más inflexible, por ejemplo, 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, etc., con el fin de elegir los átomos, residuos o zonas hidrofóbicas más fuertes. Además, como el algoritmo da números más altos a residuos en el centro de una zona, los residuos en 3A, 4A, 5A, 7,5A o 10A del residuo que cumplen el límite también pueden seleccionarse para mutación con residuos menos hidrofóbicos para reducir la agregación. En otra realización, puede ser ventajoso simplemente seleccionar átomos o residuos que tengan propensión a agregación espacial mayor que los átomos o residuos que están cercanos bien secuencialmente (esto es, a lo largo de la secuencia de proteína) o en una realización preferente, espacialmente (esto es, en la estructura tridimensional). Un método preferente para seleccionar átomos o residuos en una zona hidrofóbica es mapear los valores calculados de Espacio-Agregación-Propensión, por ejemplo, usando un código de color o un código numérico, en el modelo estructural de proteína del que se derivan, visualizado así las diferencias en el propensión a agregación espacial en la superficie de la proteína y de este modo permitiendo una selección sencilla de zonas o residuos hidrofóbicos. En una realización particularmente preferente, el cálculo para propensión a agregación espacial se realiza por separado usando dos valores elegidos para el radio, uno de resolución más alta, por ejemplo, 5Å, y uno de resolución más baja, por ejemplo, 10Å. En tal realización pueden verse zonas hidrofóbicas más grandes o amplias en la estructura de la proteína con el mapa de menor resolución. Una vez que se seleccionan las zonas hidrofóbicas de interés en el mapa de baja resolución, esas zonas pueden verse con mayor detalle en el mapa de alta resolución que, en algunas realizaciones, puede permitir a un experto en la técnica elegir residuos para mutar o modificar de manera más sencilla y precisa. Por ejemplo, cuando se ve una zona hidrofóbica en el mapa de alta resolución, puede ser deseable seleccionar para mutación el residuo que tiene la puntuación PAE más alta o el que sea más hidrofóbico (por ejemplo, el residuo más hidrofóbico en la zona de acuerdo con la escala de Black y Mould, Anal. Biochem. 1991, 193, 72-82).

En una realización específica un método para identificar una región propensa a agregación en una proteína comprende (a) mapear en el modelo estructural la PAE como se calcula de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí descritos para átomos en la proteína; y (b) identificar una región en la proteína que tenga una pluralidad de átomos que tengan un PAE > 0; donde la región propensa a agregación comprende los aminoácidos que comprenden dicha pluralidad de átomos. En tal realización la PAE puede calcularse para todos los átomos en una proteína o una parte de los átomos. Se contempla que PAE pueda calcularse para residuos particulares o grupos de residuos que sean de interés.

En una realización similar, puede ser informativo el gráfico para las puntuaciones de PAE de los átomos (o la puntuación de PAE como el promedio sobre residuos de aminoácido). Tal gráfico que muestra la puntuación de PAE a lo largo de los átomos o residuos de una proteína permite la identificación sencilla de picos, que pueden indicar candidatos para sustitución. En una realización particularmente preferente las puntuaciones de PAE a lo largo de los átomos o residuos en la proteína se representan en un gráfico y el Área Bajo la Curva (ABC) se calcula para picos en el gráfico. En tal realización, los picos con un ABC mayor representan regiones más grandes o más propensas a agregación hidrofóbica. En realizaciones particulares será deseable seleccionar para sustitución uno o más residuos que se identifican por existir en una pico o, más preferentemente, en un pico con un ABC mayor.

En realizaciones particulares la presente invención puede usarse para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para mutación a cisteína. Como aquí se usa, se calcula el valor de PAE de un primer residuo de aminoácido sobre la superficie de una inmunoglobulina. Si el valor de PAE es igual a o está entre los valores 0 y -0,11, el primer residuo se selecciona para mutación a cisteína. En una realización adicional, se calculan los valores de PAE de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina en proximidad inmediata del primer residuo. Si la pluralidad de residuos tiene valores de PAE inferiores a 0, el primer residuo se selecciona para mutación a cisteína.

Pueden hacerse variantes de inmunoglobulina mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo mutagénesis dirigida a sitio y otras tecnologías de ADN recombinante, por ejemplo, véase las patentes de Estados Unidos Números 5.284.760; 5.556.747; 5.789.166; 6.878.531; 5.932.419 y 6.391.548.

En realizaciones particulares la presente divulgación puede usarse para hacer una variante de inmunoglobulina que puede conjugarse con un átomo o molécula sustituyendo al menos un residuo de aminoácido expuesto sobre la superficie de la inmunoglobulina identificado por cualquiera de los métodos aquí descritos con un residuo de aminoácido natural, un residuo de aminoácido modificado, un residuo de aminoácido inusual, un residuo de aminoácido no natural o un análogo o derivado de aminoácido que puede usarse para conjugar la inmunoglobulina con un átomo o molécula. En realizaciones preferentes, el residuo de aminoácido expuesto sobre la superficie de la inmunoglobulina se sustituye con cisteína. En otras realizaciones, el residuo de aminoácido se sustituye con lisina, aspartato o pirrolisina.

La síntesis de aminoácido no natural es conocida por aquellos expertos en la técnica y además se describe, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos Nº 2003-0082575. En general, puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para sintetizar o incorporar aminoácidos no naturales, modificados o inusuales en proteínas, incluyendo, aunque sin limitarse a, aquellos métodos descritos o referenciados en las publicaciones Liao J. Biotechnol Prog. 2007 Ene-Feb; 23(1):28-31; Rajesh e Iqbal. Curr Pharm Biotechnol. 2006 Ago; 7(4):247-59; Cardillo et al. Mini Rev Med Chem. 2006 Mar; 6(3):293-304; Wang et al. Annu Rev Biophys Biomol

Struct. 2006; 35:225-49; Chakraborty et al., Glyconconj J. 2005 Mar; 22(3):83-93. Como un ejemplo más, puede emplearse la tecnología Ambrix ReCODE™ para desarrollar e incorporar aminoácidos no naturales o aminoácidos inusuales en proteínas como lo indican los métodos aquí descritos.

Los conjugados de inmunoglobulina y variantes de inmunoglobulina de acuerdo con la invención pueden mostrar una mayor o mejor estabilidad como lo determina, por ejemplo, SDS-PAGE no reductor.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar polinucleótidos aislados o recombinantes que codifiquen inmunoglobulinas como se ha analizado en párrafos [0008] y [0019] y cualquiera de las combinaciones de sus realizaciones. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, un promotor inducible está operativamente enlazado al polinucleótido. Otro aspecto incluye células huéspedes con el vector de cualquiera de las realizaciones precedentes. En ciertas realizaciones, las células huéspedes son capaces de expresar la inmunoglobulina codificada por el polinucleótido.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos para producir una inmunoglobulina con una propensión reducida para enlace cruzado que comprende proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped del párrafo anterior y colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales la inmunoglobulina se expresa. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen una etapa adicional de aislar la inmunoglobulina expresada.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para mutación a cisteína que comprenden calcular la propensión a agregación espacial de un primer residuo de aminoácido sobre la superficie de la inmunoglobulina, calcular las propensiones a agregación espacial de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina, calcular las propensiones a agregación espacial de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina en proximidad inmediata del primer residuo, y seleccionar el primer residuo de aminoácido para mutación a cisteína si el propensión a agregación espacial del primer residuo de aminoácido es igual o está entre los valores de 0 y -0,11 y si la pluralidad de residuos tienen propensiones a agregación espacial inferiores a 0. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está en 15Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está en 10Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está en 7,5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones, la pluralidad de residuos está en 5Å del primer residuo. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el cálculo de la propensión a agregación espacial de un residuo comprende el cálculo de la propensión a agregación espacial para una región esférica con un radio centrado en un átomo en el residuo. En ciertas realizaciones, el radio de la región esférica es al menos 5Å.

En algunas realizaciones, la invención también se refiere a un código de ordenador para determinar PAE de acuerdo con los métodos de la invención. En otras realizaciones, la invención se refiere a un ordenador, un superordenador; o grupo de ordenadores dedicados a realizar los métodos de la invención. En otro aspecto más, la invención proporciona un servicio basado en una web, servidor o internet para seleccionar residuos de una proteína para mutar a cisteína, comprendiendo el servicio la aceptación de datos sobre una proteína (por ejemplo, un modelo estructural de proteína) de un usuario (por ejemplo, sobre internet) o la recuperación de tales datos de una base de datos de tal manera que el proveedor de servicios pueda generar, recuperara o acceder a una estructura estática de la proteína, incluyendo opcionalmente el diseño gráfico de dinámica molecular de la proteína para proporcionar una estructura dinámica de la proteína, determinación de PAE para átomos o residuos de la proteína en base a la estructura estática o dinámica así generada, y el regreso de los datos PAE, por ejemplo, como un modelo estructura mapeado con dichos datos de PAE por el proveedor de servicios, a un usuario. En algunas realizaciones, el usuario es una persona. En otras realizaciones, el usuario es un sistema de ordenador o un algoritmo con ordenador automatizado.

En algunas realizaciones la presente invención prueba un sistema de cálculo PAE que comprende: un servidor web para proporcionar un servicio web para calcular PAE a una terminal de usuario a través de Internet; una base de datos para almacenar información general sobre el método de cálculo, hidrofobicidad de aminoácido, etc., y un servidor de cálculo para realizar el cálculo de PAE en base a información en la base de datos e información proporcionada o transmitida a través de internet por el usuario.

En algunas realizaciones, el servidor web y el servidor del cálculo son el mismo sistema de ordenador. En algunas realizaciones el sistema de ordenador es un superordenador, un grupo de ordenadores o una única terminal o servidor. En una realización relacionada el servidor web del sistema de cálculo de PAE comprende además un controlador para controlar toda la operación, una unidad de conexión a la red para conexión a Internet, y una unidad de servicio de web para proporcionar un servicio web para calcular PAE a la terminal de usuario conectada a través de Internet.

Además, realizaciones de la presente invención se refiere además a productos de almacenaje en ordenador con un medio legible por ordenador que contiene un código de programa para realizar varias operaciones implementadas para ordenador, por ejemplo, calcular la PAE para un modelo estructural, calcular AAD, calcular AAD

efectivo, manipular modelos estructurales, implementar simulaciones de dinámica molecular, organizar y almacenar datos relevantes o realizar otras operaciones aquí descritas. El medio legible por ordenador es cualquier dispositivo para almacenamiento de datos que pueda almacenar datos que después un sistema de ordenador los pueda leer. Ejemplos de medios legibles por ordenador incluyen, aunque no se limitan a, discos duros, disquetes, memorias portátiles, discos ópticos (por ejemplo, CDs, DVDs, HD-DVDs, discos Blu-Ray, etc.) y especialmente dispositivos hardware configurados tales como circuitos integrados para aplicaciones específicas (CIAE) o dispositivos lógicos programables (DLP). El medio legible por ordenador puede también distribuirse como una señal de datos incorporada en una onda transportadora sobre una red de sistemas de ordenador acoplados para que el código legible por ordenador se almacene y ejecute de una manera distribuida. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que los elementos de hardware y software anteriormente descritos son de diseño y construcción estándar. El ordenador, internet, servidor, y realizaciones relacionadas con el servicio descrito anteriormente pueden además aplicarse al AAD y el AAD efectivo así como PAE.

Composiciones farmacéuticas que contienen inmunoglobulinas y conjugados de inmunoglobulina

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene uno o más conjugados de inmunoglobulina producidos por los métodos de la invención, formulados junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden además administrarse en terapia de combinación, esto es, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un conjugado de inmunoglobulina de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-cáncer.

Como aquí se usa, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o todos los disolventes, medios de dispersión, capas, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos o de absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el transportador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, esto es, la inmunoglobulina o variante de la misma de la invención, puede estar recubierta por un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición bases. Las sales de adición ácidas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácidos hidrocílicos, nítricos, fosfóricos, sulfúricos, hidrobromicos, hidroyódicos, fosforosos y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos por fenilo, ácidos alcanóicos hidroxilo, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y sulfónicos aromáticos y similares. Las sales de adición bases incluyen aquellas derivadas de metales térreos alcalinos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares así como aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un anti-oxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes soluble en agua, tal como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes soluble en aceite, tales como pantoato de ascorbilo, hidroxianisola butilada (HAB), hidroxitolueno butilado (HTB), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido tetra-acético etilendiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de transportadores adecuados acuosos y no acuosos 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, ésteres orgánicos inyectable, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño adecuado de partícula en el caso de dispersiones, o mediante el uso de surfactantes.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede asegurarse mediante procesos de esterilización, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en la composición. Además, la absorción prolongada del fármaco inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tal

medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Las formulaciones ejemplares comprenden al menos un conjugado de inmunoglobulina de la invención y puede comprender concentraciones más bajas de agentes estabilizantes que pueden usarse, además de los métodos aquí desvelados, para prevenir o reducir el enlace cruzado de una inmunoglobulina. Por consiguiente, puede emplearse métodos convencionales para prevenir el enlace cruzado en el desarrollo de composiciones farmacéuticas que contienen conjugados de inmunoglobulina producidos por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, puede incluirse una variedad de compuestos estabilizantes o de desagregación en composiciones farmacéuticas de la invención dependiendo de su uso pretendido y su toxicidad biológica. Tales compuestos estabilizantes pueden incluir, por ejemplo, ciclodextrina y sus derivados (Patente de Estados Unidos N° 5.730.969), composiciones de alquilglucósido (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/474.049) el uso de moléculas de chaperona (por ejemplo, LEA (Goyal et al., Biochem. J. 2005, 388(Pt 1):151-7; el método de la patente de Estados Unidos N° 5.688.651), compuestos de betaína (Xiao, Burn, Tolbert, Bioconj Chem. 2008 Mayo 23), surfactantes (por ejemplo, Pluronic F127, Pluronic F68, Tween 20 (Wei et al. International Journal of Pharmaceutics. 2007, 338 (1-2):125-132)), y los métodos descritos en las patentes de Estados Unidos números 5.696.090, 5.688.651 y 6.420.122.

Además, las proteínas, y en particular los anticuerpos, se estabilizan en formulaciones que usan combinaciones de diferentes clases de excipientes, por ejemplo, (1) disacáridos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa) o polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol) actúan como estabilizantes por la exclusión preferencial y también son capaces de actuar como crioprotectores durante liofilización, (2) surfactantes (por ejemplo Polysorbat 80, Polysorbat 20) actúan minimizando interacciones de proteínas en interfaces como líquido/hielo, líquido/superficie de material y/o líquido/interfaces de aire y (3) tampones (por ejemplo, fosfato, citrato, histidina) ayudan a controlar y mantener el pH de la formulación. Por consiguiente, tales polioles de disacárido, surfactantes y tampones pueden usarse además de los métodos de la presente invención para estabilizar más las inmunoglobulinas y prevenir su agregación.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo condiciones de fabricación y almacenaje. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como sea necesario, seguido de microfiltración con esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de lo enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son secado con vacío y desecación por congelación (liofilización) para producir un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada del mismo.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una única forma de dosis variará dependiendo del sujeto que se está tratando y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una única forma de dosis será generalmente esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por cien, esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos para reducir el enlace cruzado entre cisteínas expuestas a la superficie de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica muy concentrada de conjugados de inmunoglobulina que comprenden proporcionar una inmunoglobulina, que sustituye el residuo 7 (VH) con un residuo de cisteína, reducir uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos, incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde la molécula es reactiva con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina, y generar una formulación líquida muy concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones la inmunoglobulina comprende un IgG1. En ciertas

realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H1} . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H2} . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_{H3} . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano C_L . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano V_H . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, la inmunoglobulina comprende un dominio humano V_L . En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina comprende una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos ochenta por ciento, al menos noventa por ciento, al menos cien por ciento, al menos, ciento diez por ciento, al menos ciento veinte por ciento o al menos ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar formulaciones de inmunoglobulina modificadas que pueden estar formadas por conjugados de inmunoglobulina de la invención y todas la combinaciones de sus realizaciones en una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones, el conjugado de inmunoglobulina está en una concentración superior a la concentración en la que se sabe que el conjugado de inmunoglobulina que tiene una propensión alta a oligomerización forma oligómeros en una solución líquida concentrada bajo las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquier de las reivindicaciones precedentes, la formulación incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones precedentes, la formulación de inmunoglobulina comprende al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento de conjugado de inmunoglobulina que es monómero no oligomerizado.

Es por lo tanto un objeto de la presente divulgación proporcionar usos de los conjugados de inmunoglobulina de la invención como un principio activo farmacéutico no oligomerizable.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que incluyen un conjugado de inmunoglobulina de la invención y cualquiera y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina está en una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones, el conjugado de inmunoglobulina está en una concentración superior a la concentración en la que se sabe que un conjugado de inmunoglobulina que tiene una propensión alta a oligomerización forma oligómeros en una solución líquida concentrada bajo las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquier de las reivindicaciones precedentes, la formulación incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones precedentes, la formulación de inmunoglobulina comprende al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento de conjugado de inmunoglobulina que es monómero no oligomerizado. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con realizaciones precedente, la oligomerización se mide mediante SDS-PAGE no reductor.

Los regímenes de dosis se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante un tiempo o la dosis puede reducirse o aumentar proporcionalmente como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilitar su administración y la uniformidad de las dosis. La forma de unidad de dosis como aquí se usa se refiere a unidades físicamente distintas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el transportador farmacéutico requerido. La especificación para la formas de unidad de dosis de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se conseguirá, y (b) las limitaciones inherente en la técnica para formar compuestos con tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para administración del conjugado de inmunoglobulina, la dosis oscila desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis puede ser 0,3 mg/kg peso corporal, 1 mg/kg peso corporal, 3 mg/kg peso corporal, 5 mg/kg peso corporal o 10 mg/peso corporal o en el rango de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al me3s, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosis preferentes para un conjugado de inmunoglobulina de la invención incluyen 1 mg/kg peso corporal o 3 mg/kg peso corporal mediante administración intravenosa, con el anticuerpo dado usando uno de los siguientes programas de dosis: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg peso corporal cada tres semanas.

Alternativamente un conjugado de inmunoglobulina de la invención puede administrarse como una formulación con liberación prolongada, en cuyo caso se requiera menos administración. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media de la sustancia administrada en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo largo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosis de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular sin ser tóxica para el paciente. El nivel seleccionado de dosis dependerá de una variedad de factores fármaco-cinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, el índice de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condiciones, saludo general e historial médico anterior del paciente que se tratará, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosis terapéuticamente efectiva" de conjugado de inmunoglobulina de la invención preferentemente da como resultado un descenso en la severidad de varios síntomas, un aumento en la frecuencia y duración de periodos de enfermedad libres de síntomas, o una prevención de discapacidad o inhabilidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosis terapéuticamente efectiva" preferentemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20%, más preferentemente al menos aproximadamente 40%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 80% en relación con sujetos no tratados. La habilidad de un compuesto para inhibir crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la habilidad del compuesto para inhibir, tal como inhibición en ensayos in vitro conocidos por un experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor, o de otra manera mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica será capaz de determinarse tales cantidades en base factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por medio de una o más rutas de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como un experto en la técnica apreciará, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferentes de administración para enlazar porciones de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como aquí se usa significa modos de administración diferente a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e inyección e infusión intracisternal.

Alternativamente, un conjugado de inmunoglobulina de la invención puede administrarse por medio de una ruta no parenteral, tal como ruta de administración tópica, epidérmica o por mucosa, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

Los compuestos activos pueden prepararse con transportadores que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración micro-encapsulada. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales

como etileno vinil acetato, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico, muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentadas o son conocidos generalmente por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferente, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las patentes de Estados Unidos Números 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que desvela una bomba implantable de micro-infusión para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de Estados Unidos N° 4.486.194 que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que desvela una bomba para infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad precisa de infusión; patente de Estados Unidos N° 4.447.224, que desvela un aparato implantable para infusión con flujo variable para una entrega continua de fármaco; patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que desvela una sistema osmótico de entrega de fármaco que tiene compartimentos multi-cámara; y patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que desvela un sistema osmótico de entrega de fármaco.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar usos de los conjugados de inmunoglobulina de la invención y cualquiera o todas las combinaciones de sus realizaciones para la preparación de un medicamento que comprende una concentración líquida muy concentrada donde la concentración de conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de fallo cardíaco congestivo (FCC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras condiciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de la médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; osteopenia difusa; malnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhan, lesión de médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa polioestótica, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, tratamiento de dolor agudo e hipercalcemia humoral maligna, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo a trasplante, infecciones virales, neoplasias hematológicas y condiciones de tipo neoplástico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas de no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfático pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de célula del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de zona marginal, leucemia de células peludas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocito, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluyendo leucemias de célula T periférica, leucemias de célula T/linfomas de célula T en adultos y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhan, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo LMA con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo tumores del cerebro (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer ovárico, cáncer primario de hígado o cáncer endometrial y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondilartritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerodermia, enfermedad injerto contra huésped (EICH), rechazo de injerto de islote alogénico, malignidades hematológicas, tales como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA), inflamación asociada con tumores, lesión de nervio periférico o enfermedades desmielinizantes. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerosa, linfoma de no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorectal, artritis idiopática juvenil, degeneración macular, virus sincicial respiratorio, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por tratamientos, metástasis ósea, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiples. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones precedentes, el conjugado de inmunoglobulina en el medicamento muestra al menos ochenta por ciento, al menos ochenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, al menos noventa y cinco por ciento, al menos noventa y seis por ciento, al menos noventa y siete por ciento, al menos noventa y ocho por ciento o al menos noventa y nueve por ciento de monómero no oligomerizado. En ciertas realizaciones, la oligomerización se mide mediante SDS-PAGE no reductor.

EJEMPLOS

Los ejemplos aquí descritos se refieren a realizaciones particulares no limitativas de la invención.

Ejemplo 1: Diseño, expresión y conjugación de variantes de cisteína de anticuerpo

Se diseñó un conjunto de variantes de cisteína IgG1 de tal manera que se representa cada dominio de pliegue de inmunoglobulina (Tabla 1). Las variantes 1-13 se diseñaron a partir de la estructura de rayos X de anticuerpo-1. La variante 14 se seleccionó de la estructura de otro IgG1, anticuerpo-2, construido mediante diseño gráfico x homología con respecto al anticuerpo-1. Todos los sitios estuvieron expuestos en la superficie de anticuerpo. Los residuos polares, tales como serina y treonina y arginina, o residuos cargados, tales como lisina se sustituyeron con cisteína. Los genes de cadena ligera y pesada se sub-clonaron en el vector gWIZ (Genlantis) y se produjeron para expresión de proteína mediante transfección transitoria de células de mamífero. Las variantes de anticuerpo fueron sintetizadas "de novo" (GeneArt) o generados mediante PCR mutagénico dirigido al sitio y confirmadas mediante secuencias. El tipo salvaje de anticuerpo y las variantes se expresaron en niveles de 10-1000 mg mediante transfección transitoria de células Freestyle HEK 293 (Invitrogen) con polietilenimina (Polysciences) como el reactivo de transfección. El sobrenadante del cultivo celular se recogió 7-10 días después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron en una columna de proteína A (GE Healthcare), eluyeron con 50 mM tampón de citrato, pH 3,5, e intercambio de tampón en 100 mM Tris pH 7,0 tampón para etiquetado fluorescente.

Después de la expresión y purificación de variantes de anticuerpo, las cisteínas de superficie producidas fueron en su mayoría oxidadas. Por ejemplo tanto la Variante 4 como 6 tenían menos de 0,3 tiol libre por molécula de anticuerpo en oposición al 2,0 anticipado para los anticuerpos con cisteínas de superficie diseñadas. Comparamos el efecto de un agente reductor suave, TCEP (Tris[2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina) y un agente reductor más fuerte, DTT (ditiotretol) en una variante de clase I y una variante de clase IV. Inicialmente, la Variante 4 no oligomerizable mostró 0,13 tiol libre por anticuerpo, y la Variante 6 altamente oligomerizable tuvo 0,25 tiol libre por anticuerpo. Las alícuotas de tipo salvaje, variante 4 y variante 5, se trataron en cinco condiciones diferentes: 1) agente no reductor, 2) TCEP, 10x, 1 hora, 3) TCEP, 20x, 1 hora, 4) DTT, 5x, 15 minutos y 5) DTT, 10x, 15 minutos. Después de retirar el agente reductor las muestras se resolvieron en PAGE no reductor y se cuantificaron para tiol libre. Una comparación de los resultados para tipo salvaje y variantes indicaron que el tratamiento con TCEP fue suficiente para reducir cisteínas en forma no oligomerizada (Variante 4) con poco efecto en WT. Sin embargo, las cisteínas de oligómeros (Variante 6) se redujeron solamente después de un tratamiento más severo. El tratamiento con DTT incluso a niveles bajos llevó a la fragmentación de anticuerpo para WT y ambas variantes. Los sitios donde se introdujeron las cisteínas de superficie tuvieron un profundo efecto en la habilidad para destapar las cisteínas diseñadas para conjugación.

Se intentaron diferentes métodos para la reducción específica de tioles de superficie diseñados antes del etiquetado. TCEP y DTT fueron dos de los reactivos usados, y los niveles de tiol libre se cuantificaron usando reactivo de Ellman (Invitrogen). Descubrimos que L-cisteína funcionaba mejor en nuestros experimentos de etiquetado específico de sitio, así que se usó el siguiente protocolo de dos etapas. Primero, las variantes se incubaron con un exceso 100-200 veces de L-cisteína durante 4 horas a 37 °C, seguido de intercambio de tampón en 50 mM Tris/EDTA. Segundo, las muestras se incubaron con un exceso de 5-10 veces de tinte de maleimida Alexa488 (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente o con un exceso de 10 veces de tinte de maleimida Pyrene (Invitrogen) durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de retirar el tinte libre, y el intercambio de tampón a 50 mM tampón de fosfato pH 7,0, la eficiencia del etiquetado de proteínas se calculó como mol de tinte por mol de proteína de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen).

Ejemplo 2: Caracterización de las variantes de cisteína de anticuerpo diseñadas

Las muestras de anticuerpo no etiquetadas y etiquetadas se analizaron mediante SDS-PAGE. Se usaron geles de 7,5%, 10% y 12% para el análisis no reductor. Los geles de 12% se usaron para reducir el análisis de muestras calentadas con DTT. Normalmente, se cargaron muestras de 5-10 µg por calle. Las imágenes fluorescentes se tomaron bajo luz UV antes de la tinción con azul de Coomassie. La digestión de anticuerpo se realizó mediante GluC (1:20 peso enzima por peso anticuerpo, a 25 °C durante 12-24 horas) y pronasa (1:20 peso enzima por peso anticuerpo, a 37 °C durante 1 hora).

Los geles no reductores mostraron monómeros así como la presencia de dímeros, trímeros y en algunos casos oligómeros incluso mayores. Los geles reductores mostraron el etiquetado exclusivo de la cadena ligera o pesada dependiendo de donde se diseñó la cisteína de superficie. Las variantes etiquetadas y no etiquetadas 1-6 también se analizaron para especificidad de enlace. Las variantes mantuvieron actividad en el 80% y 130% de tipo salvaje con algo de pérdida después del etiquetado. La variante no etiquetada 1 mantuvo aproximadamente 110% de actividad de tipo salvaje, mientras que la variante 1 etiquetada mantuvo aproximadamente 80%. La variante 2 no etiquetada mantuvo aproximadamente 105% de actividad de tipo salvaje, mientras que la variante 2 etiquetada mantuvo menos del 100% de actividad. La variante 3 no etiquetada y etiquetada mantuvo aproximadamente 110% de actividad de tipo salvaje. La variante 4 no etiquetada mantuvo aproximadamente 125% de actividad de tipo salvaje, mientras que la variante 4 etiquetada mantuvo menos del 95% de actividad. La variante 5 no etiquetada mantuvo aproximadamente 120% de actividad de tipo salvaje, mientras que la variante 5 etiquetada mantuvo menos del 100% de actividad. Finalmente, la variante no etiquetada 6 mantuvo aproximadamente 115% de actividad de tipo

salvaje, mientras que la variante 6 etiquetada mantuvo aproximadamente 90% de actividad. Similarmente a su homólogo no etiquetado, la variante 6 etiquetada mostró una alta propensión a oligomerización.

La mayoría de las variantes se etiquetaron cerca de la eficiencia óptima de 2,0 tinte de moles por anticuerpo de mol (dos cisteínas idénticas pro molécula de anticuerpo). Una eficiencia de etiquetado superior a 0,2 no es deseable ya que sugeriría interrupciones parciales y etiquetado de disulfuro intra-cadena. Las variantes con alta propensión a oligomerización tales como Variante 6, Variante 11 y Variante 5 no se etiquetaron como eficientes. Entre las otras variantes, las condiciones de etiquetado tales como tiempo de reacción y proporción de tinte con proteína tuvieron que optimizarse en una base individual porque no todas las cisteínas diseñadas estaban igualmente dispuestas a conjugación. Las variantes 4-11 se etiquetaron específicamente en la cadena que lleva la cisteína diseñada. El tratamiento proteolítico de las variantes con pronasa produjo diferentes patrones de fluorescencia para la mayoría de las variantes, pero patrones similares para variantes con sustituciones vecinas, tales como variante 3 y 12. Así, la mayoría de las variantes se etiquetaron de manera eficiente y específica.

Se distinguieron cinco clases de propensión a enlace cruzado para este conjunto de variantes de cisteína (Tabla I). La clase I comprende variantes que fueron monoméricas y permanecieron estable después del etiquetado. Las variantes de clase II contenían un pequeño porcentaje de dímeros antes y después del etiquetado. Las variantes de clase III tenían una propensión más pronunciada a oligomerizar incluyendo la formación de algunos trímeros. Las variantes de clase IV tenían una propensión incluso mayor a oligomerizar como lo prueba la presencia de agregados mayores que el trímero, especialmente después del etiquetado. La clase V incluye variantes de alta propensión a oligomerización de manera similar a la variante de clase IV con anomalías estructurales adicionales tales como fragmentación o coloración de muestra concentrada purificada.

Ejemplo 3: Aplicación de variantes de cisteína de anticuerpo diseñadas

Las variantes de cisteína con propensión a enlace cruzado (Variantes 1-4, 7, 10, 12-14) se etiquetaron con alta especificidad y eficiencia y poca oligomerización. El etiquetado con tintes de maleimida es solamente un ejemplo de conjugación específica de sitio en estas variantes de anticuerpo. Las moléculas con muchas otras anomalías tales como especificidad de enlace o toxicidad pueden unirse igualmente. Así, este conjunto de variantes se expande en el repertorio de variantes de anticuerpo para servir a vehículos de carga en terapia dirigida o para análisis de fluorescencia in vitro e in vivo.

Para ilustra la aplicación de fluorescencia de una de las variantes, analizamos el patrón de emisión de variantes conjugadas con el fluoróforo pireno. Cuando dos moléculas de pireno están juntas hay un aumento característico de emisión a 465 nm conocido como fluorescencia excímero. Etiquetamos las variantes 4 y 7 con maleimida de pireno y se controló el espectro de emisión. Mientras que la variante 4 mostró emisión a nivel basal en 465 nm, la variante 7 mostró una fuerte fluorescencia excímero. Considerando la posición de la cisteína diseñada en CH1 para la variante 7, en el lado interior de los dominios Fab, el resultado observado se correlaciona con el efecto tijera conocido del Fabs con respecto a Fc. Así, esta variante puede usarse en el análisis de dinámica de dominio de anticuerpo.

La alta propensión a oligomerización de la variante 6 sugirió otra utilidad de variantes de cisteína de anticuerpo que se exploró con más detalle. La variante etiquetada 6 se sometió a cromatografía de filtración en gel con el fin de separar el monómero de oligómeros, y las fracciones que contenían proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE no reductor 7,5% y analizaron antes y después de tinción con azul de Coomassie. El análisis de filtración en gel en la variante 6 indicó una competición entre etiquetado y enlace cruzado: a mayor PM de las especies, menor fue la eficiencia de etiquetado (indicado por el nivel de fluorescencia). Las especies con mayor PM tuvieron una eficiencia de etiquetado de 0,5, mientras que las especies monoméricas tuvieron una eficiencia de etiquetado de 1,0, con la muestra original etiquetada de la eficiencia de etiquetado 0,8. Una variante de anticuerpo con múltiples oligómeros, la variante 6, presenta un control excelente para oligomerización de anticuerpo y un estándar adecuado para proteínas de alto peso molecular, con la funcionalidad adicional de que pueden etiquetarse específicamente en el sitio.

Ejemplo 4: Correlación entre propensión a enlace cruzado (PEC) y propensión a agregación espacial (PAE) de las variantes de cisteína

La propensión a enlace cruzado (PEC) y la propensión a agregación espacial (PAE) se compararon para las variantes de cisteína donde aminoácidos específicos se sustituyeron con cisteína. A cada variante se le asignó una PEC en base se análisis SDS-PAGE no reductor. Los alores de PAE para los residuos mutaos son de resultados computacionales de radio de 5Å. Nosotros cubrimos las variantes de cisteína diseñadas en la estructura de anticuerpo-1 codificado con PAE.

Se observaron las siguientes correlaciones. Todos los aminoácidos sustituidos con cisteínas son de valor PAE negativo en el rango de -0,27 a 0,00. Esto es consistente con la elección de aminoácidos polares o cargados para sustitución. Todas las variantes de PEC clase I tienen PAE de entre 0,00 y -0,11 (Variantes 3, 4, 7, 10, 12) y todas las variantes de PAE clase II tienen PAE de entre -0,12 y -0,23 (Variantes 1, 2, 13). Sin embargo, hay

variantes con PAE en aquellos rangos con PEC alto (Variantes 8, 9 y 11, por ejemplo). Las variantes con alto enlace cruzado, variante 8 y 11 son vecinas de los sitios con alta PAE. La variante 5 con PEC III es adyacente a sitios con alta PAE en C_{H2} , mientras que la variante 2 de PEC II no lo es. Sin embargo, no hay tal correlación entre la variante 6 y la variante 10 en C_{H3} , y entre la variante 9 y 14 en V_H .

En la variante 14 se hizo una observación adicional. La variante 14 falla al expresar si hay una región de alta PAE cerca, mientras expresa cuando esta región con alta PAE se sustituye por una región de PAE baja. Se observó una producción de 100 veces más de variante 14 en el anticuerpo-2 estabilizado (cultivo de 35,6 mg/L). La producción relativa de la variante 14 en los diferentes fondos indicó un problema estructural cuando se introdujo una cisteína en la superficie de una proteína cercana a una región de alta PAE. El problema se resolvió cuando dos aminoácidos hidrofóbicos en el parche hidrofóbico vecino a la cisteína diseñada se sustituyeron con lisinas.

En resumen, existen correlaciones entre estabilidad de variantes de cisteína y PAE: 1) variantes de cisteína con baja propensión a enlace cruzado tienen PAE ligeramente negativa (0,00 a -0,11), 2) variantes de cisteína con PAE más negativa (-0,12 a -0,23) son más propensas a enlace cruzado, y 3) variantes de cisteína en inmediata proximidad a parches con alta PAE tienen más posibilidades de enlace cruzado o tienen anomalías estructurales. Las conclusiones 1 y 2 son consistentes con la noción previamente definida de que los residuos totalmente expuestos pueden ser más susceptibles a enlace cruzado [9].

Ejemplo 5 – Conclusión

Diseñamos un conjunto de variantes de cisteína IgG1 que se distribuyen ampliamente en la molécula de anticuerpo con al menos una variante por dominio de pliegue de inmunoglobulina. La mayoría de estas variantes son estables, y pueden conjugarse de manera eficiente y específica sin pérdida significativa de actividad de enlace de antígeno. Así, las variantes estable de anticuerpo añaden al repertorio de variantes conjugación específica de sitio de molécula de caga. Si se unen fluoróforos a las cisteínas diseñadas, puede analizarse la dinámica de dominios particulares. Las variantes muy oligomerizables también son beneficiosas ya que los multímeros numerosos proporcionan un estándar conveniente para agregados de anticuerpo y para proteínas de alto peso molecular en general.

Una correlación entre la propensión a enlace cruzado de las variantes de cisteína de anticuerpo aquí descritas y el método PAE demuestran que la metodología PAE puede usarse para cribar los sitios de conjugación con enlace cruzado reducido. La tecnología PAE se basa en ordenadores, de manera que reduce el tiempo y el trabajo experimental en diseño de variantes. La comparación PEC/PAE demostró que la sustitución de aminoácidos parcialmente o no totalmente expuestos produce las variantes más estables. Además, la comparación demostró que los parches hidrofóbicos vecinos deberían evitarse.

Las variantes de cisteína de superficie IgG1 humanas diseñadas aquí descritas proporcionan nuevos sitios para conjugación específica de sitio de anticuerpos terapéuticos y métodos para identificar más variantes. Las variantes con poca propensión a enlace cruzado tiene la mayor utilidad en el desarrollo de anticuerpos para terapia dirigida. Las variantes de cisteína aquí desveladas incluyen nuevos sitios en dominios previamente representados (C_L , C_{H1} , C_{H3}) así como en dominios previamente no representados (V_L , V_H , C_{H2}).

Además, las variantes etiquetadas pueden usarse como un conjunto de marcadores de anticuerpo fluorescentes específicos de sitio para investigación in vitro e in vivo en laboratorios. Los productos fluorescentemente etiquetados pueden comercializarse a través de empresas de biotecnología (tales como Thermo Scientific Pierce, GE Healthcare, e Invitrogen) que proporcionan a la comunidad investigadora reactivos de anticuerpo y otras proteínas.

La variante 6 con alto enlace cruzado es una proteína útil en cromatografía en gel u otra técnica estándar de cromatografía. Puede comercializarse a través de empresas (por ejemplo Invitrogen, Bio-Rad y Pierce) que proporcionan reactivos de proteínas.

La correlación entre PEC y PAE sugirió además una aplicación comercial de nuestra tecnología PAE previamente descrita. La consideración de PAE puede mejorar el diseño de variantes estables de cisteína de anticuerpo para conjugación específica de sitio.

Tabla 1

Variante	Dominio	Residuo	PEC	PAE
1	CH2	K248	II	-0,12
2	CH2	K326	II	-0,19
3	VL	T22	I	-0,07
4	CL	T197	I	-0,03
5	CH2	N286	III	-0,27
6	CH3	S440	IV	-0,09
7	CH1	S125	I	-0,06
8	CH2	S298	V	-0,19
9	VH	S25	III	-0,07
10	CH3	S442	I	0,00
11	CH2	S254	V	-0,06
12	VL	T20	I	-0,04
13	CH3	S415	II	-0,23
14	VH	S7	I	-0,11

Referencias

1. Carter, P. J. Terapia de anticuerpo potente por diseño. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(5): p. 343-57.
2. Polakis, P., Armando anticuerpos para terapia de cáncer. *Curr. Opin Pharmacol*, 2005. 5(4): p. 382-7.
3. Kaminski, M. S., et al., Radioimmunotherapy de linfoma de célula B con [131]anti-anticuerpo B2 (anti-CD20). *N Eng J Med*, 1993. 329(7): p. 459-65.
4. King, D. J., et al., Preparación y evaluación pre-clínica de immunoconjugados A33 humanizados para radioimmunoterapia. *Br J Cancer*, 1995. 72(6): p. 1364-72.
5. Khaw, B. A., et al., Imágenes de infarto de miocardio de anticuerpos para miosina cardiaca canina con indio-111-dietilenotriamina ácido penta-acético. *Science*, 1980. 209(4453): p. 295-7.
6. Rodwell, J. D., et al., Modificación covalente específica de sitio de anticuerpos monoclonales: evaluaciones in vivo e in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1986(8): p. 2632-6.
7. Sun, M. M. et al., Estrategias de reducción-alquilación para la modificación de disulfuros de anticuerpo monoclonales específicos. *Bioconjug Chem*, 2005. 16(5): p. 1282-90.
8. Junutula, J. R. et al., Conjugación específica de sitio de un fármaco citotóxico con un anticuerpo mejora el índice terapéutico. *Nat. Biotechnol*, 2008. 26(8): p. 925-32.
9. Lyons, A., et al., Unión específica de sitio para anticuerpos recombinantes por medio de residuos de cisteína de superficie introducidos. *Protein Eng.*, 1990. 3(8): p. 703-8.
10. Shopes, B., Un mutante IgG humano genéticamente diseñado con actividad citolítica mejorada. *J Immunol*, 1992. 148(9): p. 2918-22.
11. Shopes, B., Un mutante IgG humano genéticamente diseñado con flexibilidad limitada inicia completamente citólisis por medio de complemento. *Mol. Immunol*, 1993. 30(6): p. 603-9.
12. Stimmel, J. B., et al., Conjugación específica de sitio en anticuerpos monoclonales de variante de cisteína de flecha derecha de serian. *J. Biol. Chem*, 2000. 275(39): p. 30445-50.
13. Zheng, Y., et al., Conformaciones de IgE unido a su receptor FC epsilon RI y en solución. *Biochemistry*, 1991. 30(38): p. 9125-32.
14. Zheng, Y., et al., Conformaciones dinámicas comparadas para IgE e IgG1 en solución y unidas a receptores. *Biochemistry*, 1992. 31(33): p. 7446-56.
15. Junutula, J. R., et al., Identificación rápida de residuos de cisteína reactivos para etiquetado específico de sitio de anticuerpo-Fabs. *J. Immunol Methods*, 2008. 332(1-2): p. 41-52.

Descrito adicionalmente en la presente:

1. Un conjugado de inmunoglobulina, que comprende una inmunoglobulina que tiene al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L), 25(V_H), 125(C_{H1}), 248(C_{H2}), 254(C_{H2}), 286(C_{H2}), 298(C_{H2}), y 326(C_{H2}), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula está conjugado con el residuo de cisteína.

2. El conjugado de inmunoglobulina de la realización 1, donde la al menos una mutación es en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L) y 125(C_{H1}).
- 5 3. El conjugado de inmunoglobulina de la realización 1, donde la al menos una mutación es en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 248(C_{H2}) y 326(C_{H2}).
4. El conjugado de inmunoglobulina de la realización 1, donde la al menos una mutación es en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 25(V_H) y 286(C_{H2}).
- 10 5. El conjugado de inmunoglobulina de la realización 1, donde la al menos una mutación es en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 254(C_{H2}), 298(V_H).
6. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-5, donde la inmunoglobulina se selecciona del grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.
- 15 7. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-5, donde la inmunoglobulina comprende una IgG1.
8. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-7 que comprende un dominio de C_{H1} humano.
- 20 9. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-8 que comprende un dominio de C_{H2} humano.
10. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-9 que comprende un dominio de C_{H3} humano.
- 25 11. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-10 que comprende un dominio de C_L humano.
- 30 12. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-11 que comprende un dominio de V_H humano.
13. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-12 que comprende un dominio de V_L humano.
- 35 14. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-13, que comprende además una molécula enlazadora que tiene al menos dos sitios reactivos, donde un primer sitio reactivo está unido al residuo de cisteína de la inmunoglobulina y un segundo sitio reactivo está unido al átomo o molécula.
- 40 15. El conjugado de inmunoglobulina de la realización 14, donde la molécula enlazadora se selecciona del grupo que consiste de una hidrazona, un disulfuro, un péptido, un agente quelante y una maleimida.
16. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-15, donde el átomo o molécula se selecciona del grupo que consiste de un radionúclido, un agente quimioterapéutico, una toxina microbiana, una toxina vegetal, un polímero, un carbohidrato, una citoquina, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador enzima-sustrato, una enzima, un péptido, un peptidomimético, un nucleótido, un siARN, un microARN, un mimético de ARN, y un aptámero.
- 45 17. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-15, donde el átomo o molécula se selecciona del grupo que consiste de ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹⁷⁷Lu, ²¹³Bi, ²¹¹At, una caliqueamicina, una duocarmicina, un maytanisoide, una auristatina, una antraciclina, exotoxina A de Pseudomonas, toxina de Difteria, ricina, polietilenglicol, hidroxietilalmidón y un residuo de manosilo.
- 50 18. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-17, donde el átomo o molécula reduce la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada.
19. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-17, donde el átomo o molécula aumenta la inmunogenicidad de la inmunoglobulina no mutada.
- 55 20. El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-19, donde el conjugado de inmunoglobulina comprende además una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el cien por cien, al menos el ciento diez por ciento, al menos el ciento veinte por ciento, o al menos el ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.
- 60 65

21. Una inmunoglobulina modificada o aislada que comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L), 25(V_H), 125(C_{H1}), 248(C_{H2}), 254(C_{H2}), 286(C_{H2}), 298(C_{H2}), y 326(C_{H2}), en donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína.
- 5 22. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 21, donde la al menos una mutación está en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 7(V_H), 20(V_L), 22(V_L), 25(V_H) y 125(C_{H1}).
- 10 23. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 21, donde la al menos una mutación está en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 248(C_{H2}) y 326(C_{H2}).
24. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 21, donde la al menos una mutación está en un residuo seleccionado del grupo que consiste de 25(V_H) y 286(C_{H2}).
- 15 25. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 21, donde la al menos una mutación está en el residuo 254(C_{H2}).
26. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-25 donde la inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.
- 20 27. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-25 donde la inmunoglobulina comprende una IgG1.
28. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-27 que compre un dominio de C_{H1} humano.
- 25 29. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-28 que compre un dominio de C_{H2} humano.
- 30 30. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-29 que compre un dominio de C_{H3} humano.
31. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-30 que compre un dominio de C_L humano.
- 35 32. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-31 que compre un dominio de V_H humano.
33. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-32 que compre un dominio de V_L humano.
- 40 34. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 21-33 donde la inmunoglobulina comprende además una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el cien por ciento, al menos el ciento diez por ciento, al menos el ciento veinte por ciento o al menos el ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.
- 45 35. Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica la inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 21-34.
- 50 36. Un vector que comprende el polinucleótido de la realización 35.
37. El vector de la realización 36 que comprende además un promotor inducible unido operativamente al polinucleótido.
- 55 38. Una célula huésped que comprende el vector de la realización 36 o la realización 37.
39. Un método para producir una inmunoglobulina que comprende:
 - (a) proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped de la realización 38; y
 - (b) colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las que se expresa la inmunoglobulina.
- 60 40. El método de la realización 39 que comprende además (c) aislar la inmunoglobulina.
- 65 41. Un método para producir un conjugado de inmunoglobulina, que comprende:

- (a) proporcionar la inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 21-34;
- (b) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína sustituidos; y
- (c) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactivo con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina.
42. Un método para reducir la reticulación entre las cisteínas expuestas a la superficie de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica altamente concentrada de conjugados de inmunoglobulina que comprende:
- (a) proporcionar una inmunoglobulina;
- (b) sustituir un residuo seleccionado del grupo que consiste de $7(V_H)$, $20(V_L)$, $22(V_L)$, y $125(C_{H1})$ con un residuo de cisteína;
- (c) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos;
- (c) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde la molécula es reactiva con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina; y
- (d) generar una formulación líquida altamente concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración del conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.
43. El método de la realización 42 donde la inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.
44. El método de la realización 42 donde la inmunoglobulina comprende una IgG1.
45. El método de cualquiera de las realizaciones 42-44 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de C_{H1} humano.
46. El método de cualquiera de las realizaciones 42-45 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de C_{H2} humano.
47. El método de cualquiera de las realizaciones 42-46 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de C_{H3} humano.
48. El método de cualquiera de las realizaciones 42-47 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de C_L humano.
49. El método de cualquiera de las realizaciones 42-48 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de V_H humano.
50. El método de cualquiera de las realizaciones 42-49 donde la inmunoglobulina comprende un dominio de V_L humano.
51. El método de cualquiera de las realizaciones 42-50 donde el conjugado de inmunoglobulina comprende una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el cien por ciento, al menos el ciento diez por ciento, al menos el ciento veinte por ciento o al menos el ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.
52. El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-20 en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada donde la concentración del conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.
53. El uso de la realización 52 donde el medicamento es para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer.
54. El uso de la realización 52 donde el medicamento es para el tratamiento de fallo cardíaco congestivo (FCC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras condiciones del miocardio, lupus eritematoso

- 5 sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de la médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; osteopenia difusa; malnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhan, lesión de médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa polioestótica, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, tratamiento de dolor agudo e hipercalcemia humoral maligna, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo a trasplante, infecciones virales, neoplasias hematológicas y condiciones de tipo neoplásico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas de no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfático pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de célula del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de zona marginal, leucemia de células peludas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocito, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluyendo leucemias de célula T periférica, leucemias de célula T/linfomas de célula T en adultos y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhan, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo LMA con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo tumores del cerebro (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer ovárico, cáncer primario de hígado o cáncer endometrial y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondilartritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerodermia, enfermedad injerto contra huésped (EICH), rechazo de injerto de islote alogénico, malignidades hematológicas, tales como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mielóide aguda (LMA), inflamación asociada con tumores, lesión de nervio periférico o enfermedades desmielinizantes.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 55. El uso de la realización 52 donde el medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerosa, linfoma no de Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorectal, artritis idiopática juvenil, degeneración macular, virus sincicial respiratorio, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por tratamientos, metástasis ósea, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiples.
- 35 56. El uso de cualquiera de las realizaciones 52-55 donde el medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 57. El uso de cualquiera de las realizaciones 52-56 donde la formulación comprende al menos el ochenta por ciento, al menos el ochenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el noventa y cinco por ciento, al menos el noventa y seis por ciento, al menos el noventa y siete por ciento, al menos el noventa y ocho por ciento o al menos el noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado.
- 45 58. El uso de la realización 57 donde el porcentaje de monómeros se mide mediante análisis SDS-PAGE no reductor.
- 50 59. El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-20 como un ingrediente activo farmacéutico no oligomerizante.
- 55 60. El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 1-20 como una herramienta de diagnóstico.
- 60 61. El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las realizaciones 5-16 como un estándar para proteínas de alto peso molecular.
- 65 62. El uso de un conjugado de inmunoglobulina como un estándar para proteínas de alto peso molecular, donde el conjugado de inmunoglobulina comprende una inmunoglobulina que tiene al menos una mutación en el residuo 440(C_{H3}), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula se conjuga con el residuo de cisteína.
63. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
64. La composición farmacéutica de la realización 63 donde el conjugado de inmunoglobulina está a una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

- 5 65. La composición farmacéutica de la realización 63 o la realización 64 donde al menos el ochenta por ciento, al menos el ochenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el noventa y cinco por ciento, al menos el noventa y seis por ciento, al menos el noventa y siete por ciento, al menos el noventa y ocho por ciento o al menos el noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado.
- 10 66. Un método para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para la mutación a cisteína, que comprende:
- 15 (a) calcular la Propensión a Agregación Espacial de un primer residuo de aminoácido sobre la superficie de la inmunoglobulina,
- (b) calcular las Propensiones a Agregación Espacial de una pluralidad de residuos de la inmunoglobulina en la inmediata proximidad del primer residuo; y
- 20 (c) seleccionar el primer residuo de aminoácido para mutación a cisteína si la Propensión a Agregación Espacial del primer residuo de aminoácido es igual o está entre los valores de 0 y -0,11 y si la pluralidad de residuos tienen Propensiones a Agregación Espacio menores de 0.
67. El método de la realización 66 donde la pluralidad de residuos está dentro de 15Å del primer residuo.
68. El método de la realización 66 donde la pluralidad de residuos está dentro de 10Å del primer residuo.
- 25 69. El método de la realización 66 donde la pluralidad de residuos está dentro de 7,5Å del primer residuo.
70. El método de la realización 66 donde la pluralidad de residuos está dentro de 5Å del primer residuo.
- 30 71. El método de cualquiera de las realizaciones 66-70 donde calcular la Propensión a Agregación Espacial de un residuo comprende calcular la Propensión a Agregación Espacial para una región esférica con un radio centrado en un átomo en el residuo.
72. El método de la realización 71 donde el radio de la región esférica es al menos 5Å.
- 35 73. Una inmunoglobulina modificada o aislada que comprende al menos una mutación de un residuo expuesto a la superficie a cisteína, donde la Propensión a Agregación Espacial del residuo es igual a o está entre los valores de 0 y -0,11 y donde las Propensiones a Agregación Espacial de una pluralidad de residuos de inmunoglobulina en la proximidad inmediata del primer residuo tienen Propensiones a Agregación Espacial menores de 0.
- 40 74. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 73, donde la pluralidad de residuos está dentro de 15Å del primer residuo.
75. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 73, donde la pluralidad de residuos está dentro de 10Å del primer residuo.
- 45 76. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 73, donde la pluralidad de residuos está dentro de 7,5Å del primer residuo.
- 50 77. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 73, donde la pluralidad de residuos está dentro de 5Å del primer residuo.
78. La inmunoglobulina modificada o aislada de cualquiera de las realizaciones 73-77, donde la Propensión a Agregación Espacial se calcula para una región esférica con un radio centrado en un átomo en el residuo.
- 55 79. La inmunoglobulina modificada o aislada de la realización 78, donde el radio es al menos 5Å.
80. Un método para seleccionar un residuo de una inmunoglobulina para mutación a cisteína que comprende:
- 60 (a) elegir una pluralidad de residuos de aminoácido de la inmunoglobulina, donde la pluralidad de residuos se expone sobre la superficie de la inmunoglobulina;
- (b) mutar un residido de la pluralidad de residuos a un residuo de cisteína;
- 65 (c) conjugar el residuo de cisteína con un átomo o molécula para formar un conjugado de inmunoglobulina;

(d) evaluar el conjugado de inmunoglobulina para propensión a enlace cruzado y asignar al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado; y

5 (e) seleccionar el residuo para mutación a cisteína si el valor de propensión a enlace cruzado es I o II.

81. El método de la realización 80 que comprende además asignar al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado de II si menos del 5% del conjugado de inmunoglobulina forma dímeros y si el conjugado de inmunoglobulina no forma trímeros donde la formación de dímeros y trímeros se mide mediante SDS-PAGE comparativo reductor y no reductor.

82. El método de la realización 81 que comprende además asignar al conjugado de inmunoglobulina un valor de propensión a enlace cruzado de I si menos del 1% del conjugado de inmunoglobulina forma dímeros donde la formación de dímeros se mide mediante SDS-PAGE comparativo reductor y no reductor.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG
Massachusetts Institute Of Technology
20 CHENNAMSETTY, Naresh
HELK, Bernard
KAYSER, Veyssel
TROUT, Bernhardt VOYNOV, Vladimir

25 <120> METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE SITIOS PARA CONJUGACION DE IgG

<130> 61967-20002.40

<140> Todavía sin asignar
30 <141> Simultaneamente a la presente

<150> 61/184,084
<151> 2009-06-04

35 <160> 18
<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
40 <211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

45 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
50 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
55 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

60 <210> 2
<211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65 <400> 2

	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	1				5					10					15	
	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
5	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
10	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75					80
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
15	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys									
				100												

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

25	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	1				5					10					15	
	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
30	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
	65					70					75					80
35	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly									
				100												

<210> 4
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

50	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	1				5					10					15	
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
55	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75					80
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
60	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	Pro									
				100												

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 5

5 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
Gly

$\langle 210 \rangle$ 6

10 $\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

15 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
1 5 10

<210> 7

20 <211> 14

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

25 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 8

30 <211> 26

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

35

Leu	Gly	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Cys	Pro
1				5					10					15	
Arg	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly						
			20					25							

<210> 9

<211> 108

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

50	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
	1				5					10				15		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				20					25					30		
55	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				35				40					45			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		50					55					60				
60	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	65				70					75					80	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					85					90					95	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
				100					105							

 $\langle 210 \rangle$ 10

$\langle 211 \rangle$ 108

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```

5      Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      1      5      10      15
      Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

10     20      25      30
      Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      35      40      45
      Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
      50      55      60
15     Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
      65      70      75      80
      Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      85      90      95
20     Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      100      105

```

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```

30     Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      1      5      10      15
      Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
      20      25      30
35     Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      35      40      45
      Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
      50      55      60
40     Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
      65      70      75      80
      Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
      85      90      95
      Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      100      105

```

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

55

60

65

5
10
15

Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
1				5					10					15	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			20					25					30		
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		35				40					45				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	50					55					60				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
65				70						75					80
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
			85						90					95	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
			100					105							

<210> 13
<211> 102
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

25
30
35
40

Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
1				5					10					15	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			20					25					30		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		35				40						45			
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	50					55					60				
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
65				70						75					80
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			85						90					95	
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
			100												

<210> 14
<211> 102
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

50
55
60

Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
1				5					10					15	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			20					25					30		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		35				40						45			
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	50					55					60				
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
65				70						75					80
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			85						90					95	
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
			100												

<210> 15
<211> 102
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

5      Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
      1      5      10
      Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      20      25      30
10     Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
      35      40      45
      Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
      50      55      60
      Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
      65      70      75      80
15     Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      85      90      95
      Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      100

```

<210> 16

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

30     Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
      1      5      10      15
      Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      20      25      30
      Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
      35      40      45
35     Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
      50      55      60
      Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
      65      70      75      80
      Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Phe Thr Gln Lys Ser Leu
      85      90      95
40     Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100

```

<210> 17

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

50     Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
      1      5      10      15
      Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
      20      25      30
55     Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
      35      40      45
      Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
      50      55      60
60     Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
      65      70      75      80
      Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
      85      90      95
      Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
      100

```

ES 2 643 446 T3

<210> 18
<211> 105
<212> PRT

5 <213> Homo sapiens
<400> 18

	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
	1				5					10					15	
10	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
				20					25					30		
	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
			35					40					45			
15	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
	50						55					60				
	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
	65					70					75					80
	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
20					85					90					95	
	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
				100					105							

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un conjugado de inmunoglobulina, que comprende una inmunoglobulina que tiene al menos una mutación en el residuo 20(V_L), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína, y un átomo o molécula, donde el átomo o molécula se conjuga con el residuo de cisteína.
- 10 **2.** El conjugado de inmunoglobulina de la reivindicación 1, que además comprende una molécula enlazadora que tiene al menos dos sitios reactivos, donde un primer sitio reactivo está unido al residuo de cisteína de la inmunoglobulina y un segundo sitio reactivo está unido al átomo o molécula.
- 15 **3.** El conjugado de inmunoglobulina de la reivindicación 2, donde la molécula enlazadora se selecciona del grupo consistente en una hidrazona, un disulfuro, un péptido, un agente quelante y una maleimida.
- 20 **4.** El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el átomo o molécula se selecciona del grupo que consiste de un radionúclido, un agente quimioterapéutico, una toxina microbiana, una toxina vegetal, un polímero, un carbohidrato, una citoquina, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta enzima-sustrato, una enzima, un péptido, un péptido mimético, un nucleótido, un siARN, un microARN, un ARN mimético y un aptámero; o donde el átomo o molécula se selecciona del grupo que consiste de ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹⁷⁷Lu, ²¹³Bi, ²¹¹At, una calicheamicina, una duocarmicina, un maitansinoide, una auristatina, una antraciclina, exotoxina A Pseudomona, toxina de Difteria, ricina, polietilenglicol, almidón de hidroxietilo y un residuo de manosil.
- 25 **5.** El conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el conjugado de inmunoglobulina comprende además una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el cien por ciento, al menos el ciento diez por ciento, al menos el ciento veinte por ciento o al menos el ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.
- 30 **6.** Una inmunoglobulina modificada o aislada que comprende al menos una mutación en el residuo 20(V_L), donde la al menos una mutación es una sustitución con un residuo de cisteína.
- 7.** Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica la inmunoglobulina de la reivindicación 6.
- 8.** Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7 unido operativamente a un promotor inducible.
- 35 **9.** Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8.
- 10.** Un método para producir una inmunoglobulina que comprende:
 - 40 (a) proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped de la reivindicación 9; y
 - (b) colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las que se expresa la inmunoglobulina.
- 11.** Un método para producir un conjugado de inmunoglobulina, que comprende:
 - 45 (a) proporcionar la inmunoglobulina de la reivindicación 6;
 - (b) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos; y
 - (c) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactivo con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina.
- 50 **12.** Un método para reducir el enlace cruzado entre cisteínas expuestas a la superficie de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica altamente concentrada de conjugados de inmunoglobulina que comprende:
 - 55 (a) proporcionar una inmunoglobulina;
 - (b) sustituir el residuo 20(V_L) con un residuo de cisteína;
 - (c) reducir el uno o más residuos de cisteína sustituidos con un agente reductor para formar residuos de cisteína reducidos;
 - (d) incubar la inmunoglobulina con un átomo o molécula, donde el átomo o molécula es reactivo con los residuos de cisteína reducidos, para formar un conjugado de inmunoglobulina; y
 - 60 (e) generar una formulación líquida altamente concentrada del conjugado de inmunoglobulina donde la concentración de conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.
- 65 **13.** El método de la reivindicación 12 donde el conjugado de inmunoglobulina comprende una actividad de enlace de antígeno y la actividad es al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el cien por

ciento, al menos el ciento diez por ciento, al menos el ciento veinte por ciento, o al menos el ciento treinta por ciento de la actividad de enlace de antígeno de la inmunoglobulina no mutada.

- 5 **14.** El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada donde la concentración del conjugado de inmunoglobulina es al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml, y donde al menos el ochenta por ciento, al menos el ochenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el noventa y cinco por ciento, al menos el noventa y seis por ciento, al menos el noventa y siete por ciento, al menos el noventa y ocho por ciento o al menos el noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado.
- 10
- 15.** El uso del conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como una herramienta de diagnóstico.
- 15
- 16.** Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde al menos el ochenta por ciento, al menos el ochenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, al menos el noventa y cinco por ciento, al menos el noventa y seis por ciento, al menos el noventa y siete por ciento, al menos el noventa y ocho por ciento, o al menos el noventa y nueve por ciento del conjugado de inmunoglobulina es monómero no oligomerizado, y/o donde el
- 20 conjugado de inmunoglobulina está en una concentración de al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65