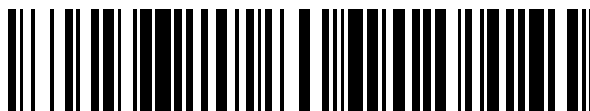


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 591**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

G06F 19/00 (2008.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2009 PCT/US2009/047948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09155513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2009 E 09767822 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2310412**

54 Título: **Inmunoglobulinas con agregación reducida**

30 Prioridad:

20.06.2008 US 74466 P
10.02.2009 US 151368 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2018

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 2 669 591 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).

Inmunoglobulinas con agregación reducida**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente descripción se refiere a inmunoglobulinas mejoradas que tienen agregación reducida.

ANTECEDENTES

10 [0002] Entender y controlar la estabilidad de la proteína ha sido un esfuerzo codiciado para Biólogos, Químicos e Ingenieros. El primer vínculo entre la sustitución de aminoácidos y la enfermedad (Ingram. Nature, 1957, 180 (4581): 326-8) Ofreció una perspectiva nueva y esencial sobre la estabilidad de las proteínas en la salud y la enfermedad. El reciente aumento tremendo de productos farmacéuticos a base de proteínas, particularmente productos
15 farmacéuticos basados en inmunoglobulinas, ha creado un nuevo desafío. Las proteínas terapéuticas se almacenan en líquido durante varios meses a concentraciones muy altas. El porcentaje de especies no monoméricas aumenta con el tiempo. A medida que se forman los agregados, no solo disminuye la eficacia del producto, sino que pueden producirse efectos secundarios tales como la respuesta inmunológica tras la administración. Es imperativo garantizar la estabilidad de los productos farmacéuticos proteínicos para la vida útil del producto.

20 [0003] Debido a su potencial en la cura de diversas enfermedades, los anticuerpos constituyen actualmente la clase de terapias humanas de crecimiento más rápido (Carter. Nature Reviews Immunology. 2006, 6 (5), 343). Desde 2001, su mercado ha estado creciendo a una tasa de crecimiento anual promedio del 35%, la tasa más alta entre todas las categorías de medicamentos biotecnológicos (S. Aggarwal, Nature, BioTech, 2007, 25 (10) 1097).

25 [0004] Las inmunoglobulinas terapéuticas se preparan y almacenan en soluciones acuosas a altas concentraciones, según se requiera para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, estas inmunoglobulinas son termodinámicamente inestables en estas condiciones y se degradan debido a la agregación. La agregación a su vez conduce a una disminución de la actividad de anticuerpos que hace que el fármaco sea ineficaz e incluso puede generar una respuesta inmunológica. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de generar inmunoglobulinas terapéuticas que sean menos propensas a la agregación.

30 [0005] El documento EP1810979 describe anticuerpos IgG humanos supuestamente estabilizados. El documento US 2005/244403 describe variantes de inmunoglobulina fuera de la región Fc. Lu et al. (2008) Journal of Pharmaceutical Sciences 97 (2): 960-9 describe el efecto de una mutación puntual sobre la estabilidad de IgG4 según se controla mediante ultracentrifugación analítica. El documento WO 03/074679 describe la optimización de anticuerpos. CN1958615 describe un anticuerpo anti-CD20.

35 [0006] Numerosos enfoques existentes para prevenir la agregación de inmunoglobulinas emplean el uso de aditivos en formulaciones de proteínas. Esto es diferente del enfoque directo descrito en este documento en el que la propia inmunoglobulina se modifica basándose en las regiones propensas a la agregación predichas a partir de simulaciones moleculares. Los aditivos usados comúnmente en la estabilización de anticuerpos son sales de bases que contienen nitrógeno, tales como arginina, guanidina o imidazol (EP0025275). Otros aditivos adecuados para la estabilización son poliéteres (EPA0018609), glicerina, albúmina y sulfato de dextrano (Patente de Estados Unidos N° 4808705), detergentes y tensioactivos tales como tensioactivos basados en polisorbato (publicación DE2652636, y publicación GB2175906 (solicitud de patente del Reino Unido n° GB8514349)), chaperonas tales como GroEL (Mendoza, Biotechnol Tech. 1991, (10) 535-540), tampón de citrato (WO9322335) o agentes quelantes (documento WO9115509). Aunque estos aditivos permiten que las proteínas se estabilicen hasta cierto punto en solución, adolecen de ciertas desventajas tales como la necesidad de pasos de procesamiento adicionales para la eliminación de aditivos.

40 [0007] Se han generado variantes de inmunoglobulina optimizadas para mejorar otras características tales como la unión del receptor de Fc. A modo de ejemplo, se generó un género de doscientas dieciséis variantes de anticuerpo (que incluyen especies mutantes L234 y L235) y se ensayó el efecto tras la unión a FcγRIIIa y FcγRIIb como se describe en la patente de EE.UU. Publ. 2004/0132101 (Lazar et al.). Sin embargo, Lazar et al. no evaluaron ninguna de las variantes de anticuerpos por su propensión a la agregación.

45 [0008] Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones de inmunoglobulinas mejoradas, tales como agentes terapéuticos de anticuerpos, que se estabilicen directamente sin el uso de aditivos.

60 RESUMEN

[0009] La invención proporciona una formulación de inmunoglobulina modificada que comprende una
50 inmunoglobulina modificada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en residuos de un motivo de agregación 1: 174 (C_{H1}), 175 (C_{H1}), y 181 (C_{H1}); un motivo de agregación 2: 226 (bisagra), 227 (bisagra), 228

(bisagra), 229 (bisagra), 230 (bisagra), 231 (bisagra) y 232 (bisagra); un motivo de agregación 4: 252 (C_{H2}) y 253 (C_{H2}); un motivo de agregación 5: 282 (C_{H2}); un motivo de agregación 6: 291 (C_{H2}); un motivo de agregación 7: 296 (C_{H2}); un motivo de agregación 8: 308 (C_{H2}) y 309 (C_{H2}); un motivo de agregación 9: 328 (C_{H2}), 329 (C_{H2}), 330 (C_{H2}) y 331 (C_{H2}); un motivo de agregación 10: 395 (C_{H3}), 396 (C_{H3}), 397 (C_{H3}), 398 (C_{H3}) y 404 (C_{H3}); un motivo de agregación 11: 443 (C_{H3}), en el que la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el resto en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada, en donde la inmunoglobulina no modificada comprende las secuencias de dominio constante de: (a) SEQ ID NOs: 1, 5, 9 y 13, (b) SEQ ID NOs: 2, 6, 10 y 14, (c) SEQ ID NOs: 3, 7, 11 y 15, o (d) SEQ ID NOs: 4, 8, 12 y 16, donde la inmunoglobulina comprende además una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana, y en donde la inmunoglobulina está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml.

[0010] La invención proporciona además un polinucleótido aislado o recombinante que codifica la inmunoglobulina de la invención.

[0011] La invención proporciona además un vector que comprende el polinucleótido.

[0012] La invención proporciona además un método para producir una inmunoglobulina con una propensión a la agregación reducida que comprende:

- (a) proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped que comprende el vector de la invención; y
- (b) colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales se expresa la inmunoglobulina; y
- (c) opcionalmente, aislar la inmunoglobulina.

[0013] La invención proporciona además el uso de la inmunoglobulina modificada de la invención en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml, que comprende opcionalmente además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0014] La invención proporciona además el uso de la inmunoglobulina modificada de la invención como un ingrediente activo farmacéutico no agregante.

[0015] En este documento, se describen inmunoglobulinas mejoradas que muestran una agregación reducida y/o estabilidad mejorada que satisfacen esta necesidad.

[0016] Por lo tanto, un aspecto incluye inmunoglobulinas modificadas y/o aisladas que tienen una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo en un dominio conservado de la inmunoglobulina que (i) tiene una propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) de al menos 0,15, o (ii) tiene una propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) superior a 0,0 y está dentro de 5Å de un residuo con una propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) de al menos 0,15, donde la al menos una mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que disminuye la propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) del residuo en comparación con la inmunoglobulina no mutada y la propensión a la agregación reducida es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina y asparagina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de lisina. La propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la escala de hidrofobicidad de molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene

una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0017] Otro aspecto incluye una inmunoglobulina modificada o aislada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en residuos de un motivo de agregación 1: 174 (C_{H1}), 175 (C_{H1}) y 181 (C_{H1}); un motivo de agregación 2: 226 (bisagra), 227 (bisagra), 228 (bisagra), 229 (bisagra), 230 (bisagra), 231 (bisagra) y 232 (bisagra); un motivo de agregación 3: 234 (bisagra) y 235 (bisagra); un motivo de agregación 4: 252 (C_{H2}) y 253 (C_{H2}); un motivo de agregación 5: 282 (C_{H2}); un motivo de agregación 6: 291 (C_{H2}); un motivo de agregación 7: 296 (C_{H2}); un motivo de agregación 8: 308 (C_{H2}) y 309 (C_{H2}); un motivo de agregación 9: 328 (C_{H2}), 329 (C_{H2}), 330 (C_{H2}) y 331 (C_{H2}); un motivo de agregación 10: 395 (C_{H3}), 396 (C_{H3}), 397 (C_{H3}), 398 (C_{H3}) y 404 (C_{H3}); un motivo de agregación 11: 443 (C_{H3}); un motivo de agregación 12: 110 (C_L) y 111 (C_L); un motivo de agregación 13: 153 (C_L) y 154 (C_L); y un motivo de agregación 14: 201 (C_L), donde la al menos una mutación reductora de agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el resto en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación reducida es la agregación entre inmunoglobulina moléculas en una solución líquida concentrada; y en donde los números de residuo son los números de residuos de Kabat correspondientes en IgG1 en base al alineamiento con la secuencia de IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, el residuo de mutación reductora de la agregación es 253 (C_{H2}) o 309 (C_{H2}). En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores que tienen una segunda mutación reductora de la agregación, la mutación reductora de la agregación y la segunda mutación reductora de la agregación están en diferentes motivos de agregación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene al menos catorce mutaciones reductoras de la agregación en las que cada mutación reductora de la agregación se selecciona de un motivo de agregación diferente. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina y asparagina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un residuo de lisina. La propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la escala de hidrofobicidad del molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina comprende una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0018] Otro aspecto incluye formulaciones de inmunoglobulinas modificadas que pueden estar compuestas por inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores a una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos treinta y cinco por ciento, al menos cuarenta por ciento o al menos una cincuenta por ciento menos de agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas

realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0019] Todavía otro aspecto incluye polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, el polinucleótido está en un vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, un promotor inducible se une operativamente al polinucleótido. Otro aspecto incluye células anfitrionas con el vector de cualquiera de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras son capaces de expresar la inmunoglobulina codificada por el polinucleótido.

[0020] Otro aspecto incluye métodos para producir una inmunoglobulina con una propensión a la agregación reducida que comprende proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped del aspecto anterior y colocar el medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen una etapa adicional de aislamiento de la inmunoglobulina expresada.

[0021] Otro aspecto incluye métodos para reducir la propensión a la agregación de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica altamente concentrada que comprende proporcionar una inmunoglobulina que es propensa a la agregación; la sustitución de un residuo en un dominio conservado de la inmunoglobulina que (i) tiene una propensión a la agregación espacial de al menos 0,15, o (ii) tiene una propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) mayor de 0,0 y es dentro de 5Å de un residuo que tiene una propensión de agregación espacial de al menos 0,15, con un residuo de aminoácido que disminuye la propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å), y que genera una formulación líquida altamente concentrada de la inmunoglobulina modificada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es de 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 en donde la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada.

[0022] Otro aspecto incluye usos de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es de al menos 20 mg/ml, a 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 la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), vasculitis, rosácea, acné, eccema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales, y estroma de médula ósea; pérdida de hueso; enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; desuso osteopenia; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa polioestótica, reconstrucción periodontal y fracturas óseas; sarcoidosis; cánceres de hueso osteolítico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer de recto; metástasis óseas, manejo del dolor óseo e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes, infecciones virales, neoplasias hematológicas y afecciones de tipo neoplásico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmácica), tumores de células precursoras de linfocito, incluida la leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B, y leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T, timoma, tumores de células T y NK maduras, incluidas las leucemias de células T periféricas, leucemia de células T adultas/ linfomas de células T y leucemia linfocítica granular, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, que incluyen LMA con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluida la leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, p. ej., tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma basocelular, cáncer de páncreas, cáncer de la vía biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático primario o cáncer de endometrio, y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondiloartritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, scleroderma, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), rechazo alogénico de injerto de islotes, neoplasias hematológicas, como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mielógena aguda (LMA), inflamación asociada a tumores, lesión del nervio periférico o enfermedades desmielinizantes. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerosa, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorrectal, artritis idiopática juvenil, degeneración

macular, virus sincicial respiratorio, enfermedad de Crohn, artritis reumatoidea, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por el tratamiento, metástasis óseas, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uso del medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina en el medicamento muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregados después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0023] Otro aspecto incluye usos de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores como un ingrediente activo farmacéutico no agregante.

[0024] Otro aspecto incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina está en una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0025] Otro aspecto incluye una inmunoglobulina modificada o aislada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en 235 (bisagra), 241 (C_{H2}), 243 (C_{H2}), 282 (C_{H2}), y 309 (C_{H2}), en donde si se selecciona el residuo 235, se muta a un glutamato o a una serina, si se selecciona el residuo 282, se muta a una lisina, y si se selecciona el residuo 309, se muta a una lisina, y donde la al menos una mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el resto en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación reducida es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada; y en donde los números de residuo son los números de residuos de Kabat correspondientes en IgG1 en base al alineamiento con la secuencia de IgG1. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación reductora de agregación es una mutación del residuo 282 a lisina, y la inmunoglobulina modificada o aislada comprende además una segunda y una tercera mutación reductora de agregación, en donde la segunda mutación reductora de agregación es una mutación del residuo 235 a lisina y la tercera mutación reductora de la agregación es una mutación del residuo 309 a lisina. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina tiene una segunda mutación reductora de la agregación en un residuo hidrófobo, donde la al menos una mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el residuo en la inmunoglobulina no modificada. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores que tienen una segunda mutación reductora de la agregación, la mutación reductora de la agregación y la segunda mutación reductora de la agregación están en diferentes motivos de agregación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene al menos catorce mutaciones reductoras de la agregación en las que cada mutación reductora de la agregación se selecciona de un motivo de agregación diferente. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina, asparagina, tirosina y serina. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, serina, glutamato y tirosina. La propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la

escala de hidrofobicidad del molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina comprende una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0026] Otro aspecto incluye formulaciones de inmunoglobulinas modificadas que pueden estar compuestas por inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores a una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con formas de realización precedentes, 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0027] Todavía otro aspecto incluye polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, el polinucleótido está en un vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, un promotor inducible se une operativamente al polinucleótido. Otro aspecto incluye células anfitrionas con el vector de cualquiera de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras son capaces de expresar la inmunoglobulina codificada por el polinucleótido.

[0028] Otro aspecto incluye métodos para producir una inmunoglobulina con una propensión a la agregación reducida que comprende proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped del aspecto anterior y colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales se expresa la inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen una etapa adicional de aislamiento de la inmunoglobulina expresada.

[0029] Otro aspecto incluye usos de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es de 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 la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de la médula ósea; pérdida de hueso; Enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; osteopenia de desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa poliostótica, reconstrucción periodontal y fracturas óseas; sarcoidosis; cánceres de hueso osteolítico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer de recto; metástasis óseas, manejo del dolor óseo e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de

trasplantes, infecciones virales, neoplasias hematológicas y afecciones de tipo neoplásico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, fungoide de micosis, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras linfocíticas, incluida la leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células B, y leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluidas las leucemias de células T periféricas, leucemia de células T adultas/linfomas de células T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides como leucemias mielógenas agudas, incluida la AML con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluida la leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, p. ej., tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma basocelular, cáncer de páncreas, cáncer de la vía biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer de ovario, cáncer primario, cáncer de hígado o endometrio, y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondiloartritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino (EII), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo alógeno de injerto de islotes, neoplasias hematológicas, como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia mielógena aguda (AML), inflamación asociada a tumores, lesión del nervio periférico o enfermedades desmielinizantes. En ciertas realizaciones, el uso del medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerativa, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorrectal, artritis idiopática juvenil, degeneración macular, virus sincicial respiratorio, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por el tratamiento, metástasis óseas, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uso del medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina en el medicamento muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregados después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0030] Otro aspecto incluye usos de cualquiera de los aspectos de inmunoglobulina modificados anteriores y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores como un ingrediente activo farmacéutico no agregante.

[0031] Otro aspecto incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina de cualquiera de los aspectos precedentes y cualquiera y todas las combinaciones de las realizaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina está en una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

[0032] Se pueden encontrar aspectos y realizaciones adicionales de la invención en toda la memoria descriptiva.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0033] La presente descripción se refiere a inmunoglobulinas mejoradas, particularmente anticuerpos humanos, que tienen agregación reducida. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas de la divulgación se modifican en

residuos hidrófobos específicos dentro de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de la inmunoglobulina. La descripción proporciona inmunoglobulinas modificadas, métodos para preparar tales inmunoglobulinas, inmunoconjugados y moléculas multivalentes o multiespecíficas que comprenden tales inmunoglobulinas y composiciones farmacéuticas que contienen las inmunoglobulinas, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la divulgación.

Definiciones

[0034] El término "anticuerpo" tal como se denomina en la presente memoria incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas únicas de los mismos. Un "anticuerpo" natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH_1 , CH_2 y CH_3 . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

[0035] El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), como se usa en el presente documento, se refiere a una longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno y al menos una parte de la región constante de la cadena pesada o ligera. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y CH_1 ; 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 que consiste en los dominios V_H y CH_1 ; y un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo.

[0036] Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423 - 426 y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión "región de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[0037] Un anticuerpo o inmunoglobulina "aislada", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina que está sustancialmente libre de otros componentes en los que dichos anticuerpos o inmunoglobulina se encuentran naturalmente. Además, un anticuerpo aislado o inmunoglobulina puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0038] Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal típicamente muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

[0039] El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como 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 la línea germinal humana o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias consenso del marco derivadas del análisis de secuencias estructurales humanas como se describe en Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57 - 86).

[0040] Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

[0041] El término "dominio humano", como se usa en este documento, pretende incluir dominios de la región constante de inmunoglobulina derivados de secuencias de origen humano, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contienen secuencias consenso del marco derivadas del análisis de secuencias de marco humano como se describe en Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57 - 86).

[0042] El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos, anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos humanos combinatoria y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de la totalidad o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de, y están relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[0043] Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se puede modificar reemplazando su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana que comprende una modificación como se describe en este documento. Debido al reemplazo con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad mientras que tiene una antigenicidad reducida en la agregación humana y agregada reducida en general en comparación con el anticuerpo de ratón original o un anticuerpo quimérico sin la modificación como se describe en este documento.

[0044] Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras que es menos inmunogénico en humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, reteniendo las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos (es decir, la región constante así como las porciones de marco de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 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, pero no se limitan a, tecnología Xoma descrita en el documento US 5.766.886.

[0045] El término "Humaneering" como se usa en el presente documento se refiere a un método para convertir anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos modificados genéticamente (véase, por ejemplo, la tecnología Humaneering™ de KaloBios).

[0046] Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a cualquier clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG2) que proporcionan los genes de la región constante de la cadena pesada que tienen los motivos propensos a la agregación descritos aquí (y por lo tanto son susceptibles a las modificaciones reveladas en este documento que reducen la agregación).

[0047] Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad. Las modificaciones descritas en este documento preferiblemente no reducen la afinidad de la inmunoglobulina o los anticuerpos descritos en la presente memoria 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 se usa en el presente documento, cuando se determina si las modificaciones descritas en este documento reducen la afinidad, se realiza la comparación entre la inmunoglobulina o el anticuerpo con la modificación y la misma inmunoglobulina que carece de la modificación, pero que incluye mutaciones no relacionadas. A modo de ejemplo, un anticuerpo humanizado con una mutación L234K como se describe en el presente documento se compararía con el anticuerpo humanizado con la misma secuencia exacta, excepto para el tipo salvaje L234.

[0048] Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

[0049] El término "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

[0050] Como se usa en este documento, el término "optimizado" significa que una secuencia de nucleótidos se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de ovario de hámster chino ($C_{H}O$) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se modifica por ingeniería genética para retener por completo o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia "parental". La expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucarióticas también se contempla aquí. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan optimizadas.

[0051] El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

[0052] El término "variante conservativamente modificada" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservativamente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar 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.

[0053] Para las secuencias polipeptídicas, las "variantes modificadas conservativamente" incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia polipeptídica que da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservadas modificadas son adicionales a, y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la divulgación. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras 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) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

[0054] Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se compara y alinea para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando una de los siguientes algoritmos de comparaciones secuenciales o por alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente en una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

[0055] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Cuando se comparan dos secuencias de identidad, no es necesario que las secuencias sean contiguas, pero cualquier brecha conllevaría una penalización que reduciría el porcentaje global de identidad. Para blastn, los parámetros predeterminados son penalización de apertura de hueco = 5 y penalización de extensión de hueco = 2. Para blastp, los parámetros predeterminados son penalización de apertura de hueco = 11 y penalización de extensión de hueco = 1.

[0056] Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, incluye referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas que incluyen, pero no se limitan a, de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de forma óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003)).

[0057] Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389 - 3402, 1977; y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403 - 410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., *Supra*). Estos aciertos de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Los puntajes acumulados se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos que no coinciden, siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulado va a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas cadenas.

[0058] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:5873-5787, 1993). Una medida 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 cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

[0059] Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es reactivo inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo núcleo ácido, como se describe a continuación. De este modo, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

[0060] El término "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está operativamente unida a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedadora apropiada u otro sistema de expresión. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción del promotor que están operativamente ligadas a una secuencia transcrita son contiguas físicamente a la secuencia transcrita, es decir, están actuando en cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o localizadas muy cerca de las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

[0061] El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, la descripción pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

[0062] El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos están destinados a referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento.

[0063] El término "antígeno diana" se refiere al antígeno contra el que se generó la inmunoglobulina precursora o se generó de otro modo (por ejemplo, mediante presentación en fago).

[0064] El término "inmunoglobulina no mutada" se refiere a la inmunoglobulina que no comprende al menos una mutación reductora de la agregación. Como se usa en el presente documento, la inmunoglobulina no mutada puede ser una construcción hipotética con el fin de comparar la propensión a la agregación o la afinidad de unión de la inmunoglobulina con y sin las mutaciones reductoras de la agregación. A modo de ejemplo, un anticuerpo murino que incluye mutaciones humanizadoras así como mutaciones reductoras de la agregación no es la inmunoglobulina no mutada. La inmunoglobulina no mutada sería el anticuerpo con las mutaciones humanizadoras, pero sin las mutaciones reductoras de la agregación. Cuando una mutación está destinada a servir a más de un objetivo, incluida la reducción de la agregación, la inmunoglobulina no mutada no incluye dicha mutación.

[0065] El término "motivo de agregación" se refiere a un conjunto de residuos agrupados en base al siguiente proceso. En primer lugar, se identifican los residuos que tienen un SAP (radio de 5Å) mayor que 0,15. Entonces, se identifican todos los residuos dentro de 5 Å de cada residuo que tiene un SAP (radio de 5Å) mayor que 0,15. Un motivo es entonces el residuo con un SAP (radio de 5Å) mayor que 0,15 y todos los residuos con un SAP (radio de 5Å) mayor que 0,0 dentro de 5Å del residuo con un SAP (radio de 5Å) mayor que 0,15. Cualquiera de estos motivos que tienen al menos un residuo en común se fusionan en un motivo más grande de forma reiterativa hasta que no quedan motivos restantes que tienen un residuo en común. Estos motivos restantes o conjuntos de residuos constituyen motivos de agregación. La Tabla 2 a continuación expone los motivos de agregación para los dominios constantes de IgG.

[0066] Aquí se describe una inmunoglobulina modificada o aislada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en residuos de un motivo de agregación 1:174 (C_{H1}), 175 (C_{H1}) y 181 (C_{H1}); un motivo de agregación 2:226 (bisagra), 227 (bisagra), 228 (bisagra), 229 (bisagra), 230 (bisagra), 231 (bisagra) y 232 (bisagra); un motivo de agregación 3:234 (bisagra) y 235 (bisagra); un motivo de agregación 4:252 (C_{H2}) y 253 (C_{H2}); un motivo de agregación 5:282 (C_{H2}); un motivo de agregación 6:291 (C_{H2}); un motivo de agregación 7:296 (C_{H2}); un motivo de agregación 8:308 (C_{H2}) y 309 (C_{H2}); un motivo de agregación 9:328 (C_{H2}), 329 (C_{H2}), 330 (C_{H2}) y 331 (C_{H2}); un motivo de agregación 10:395 (C_{H3}), 396 (C_{H3}), 397 (C_{H3}), 398 (C_{H3}) y 404 (C_{H3}); un motivo de agregación 11:443 (C_{H3}); un motivo de agregación 12:110 (C_L) y 111 (C_L); un motivo de agregación 13:153 (C_L) y 154 (C_L); y un motivo de agregación 14:201 (C_L), donde la al menos una mutación reductora de agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el resto en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación reducida es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada; y en donde los números de residuo son los números de residuos de Kabat correspondientes en IgG1 en base al alineamiento con la secuencia de IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, el residuo de mutación reductora de la agregación es 253 (C_{H2}) o 309 (C_{H2}). En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores que tienen una segunda mutación reductora de la agregación, la mutación reductora de la agregación y la segunda mutación reductora de la agregación están en diferentes motivos de agregación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene al menos catorce mutaciones reductoras de la agregación en las que cada mutación reductora de la agregación se selecciona de un motivo de agregación diferente. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la

agregación es la sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina y asparagina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un residuo de lisina. La propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la escala de hidrofobicidad del molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina comprende una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0067] Aquí se describe una inmunoglobulina modificada o aislada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en 235 (bisagra), 241 (C_{H2}), 243 (C_{H2}), 282 (C_{H2}) y 309 (C_{H2}), en donde, si se selecciona el residuo 235, se muta a un glutamato o a una serina, si se selecciona el residuo 282, se muta a una lisina, y si se selecciona el resto 309, es mutada a una lisina, y en donde la al menos una mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el residuo en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada; y en donde los números de residuo son los números de residuos de Kabat correspondientes en IgG1 en base al alineamiento con la secuencia de IgG1. En ciertas realizaciones, la al menos una mutación reductora de agregación es una mutación del residuo 282 a lisina, y la inmunoglobulina modificada o aislada comprende además una segunda y una tercera mutación reductora de agregación, en donde la segunda mutación reductora de agregación es una mutación del residuo 235 a lisina y la tercera mutación reductora de la agregación es una mutación del residuo 309 a lisina. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina tiene una segunda mutación reductora de la agregación en un residuo hidrófobo, donde la al menos una mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el residuo en la inmunoglobulina no modificada. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores que tienen una segunda mutación reductora de la agregación, la mutación reductora de la agregación y la segunda mutación reductora de la agregación están en diferentes motivos de agregación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene al menos catorce mutaciones reductoras de la agregación en las que cada mutación reductora de la agregación se selecciona de un motivo de agregación diferente. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina, asparagina, tirosina y serina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es la sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, serina, glutamato e histidina. La propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la escala de hidrofobicidad del molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina comprende una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0068] Cuando los residuos de inmunoglobulina se mencionan en este documento en número, el número de residuo se refiere al número de Kabat del residuo correspondiente en la molécula de IgG1 cuando la secuencia de

ES 2 669 591 T3

inmunoglobulina de interés se alinea con la inmunoglobulina de IgG1 humana. A modo de referencia, los dominios constantes IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos están alineados:

Dominio CH1:

```

5
  IgG1 (SEQ ID NO: 1)
  IgG2 (SEQ ID NO: 2)
  IgG4 (SEQ ID NO: 3)
  IgG3 (SEQ ID NO: 4)
10
      ..A..   loop   ....B.... loop..C... C'loop..D.
      120     130     140     150     160     170
      |       |       |       |       |       |
15  IgG1 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
    IgG2 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
    IgG4 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
    IgG3 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
20  .. loop ...E..... loop. ...F... loop ..G....join
      180     190     200     210     220
      |       |       |       |       |
25  IgG1 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDRVEPKSC
    IgG2 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC
    IgG4 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDRVESKYG
    IgG3 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDRVEPKTP

```

Bisagra:

```

30
  IgG1 (SEQ ID NO: 5)
  IgG2 (SEQ ID NO: 6)
  IgG4 (SEQ ID NO: 7)
  IgG3 (SEQ ID NO: 8)
35
      superior                medio bajo
      230
      |
40  IgG1 -DKTHT ----- CPPCP APELLGG
    IgG2 -VE--- ----- CPPCP AP-PVAG
    IgG4 -PP--- ----- CPSCP APEFLGG
45  IgG3 LGTTHT CPRCPEPK***** CPRCP APELLGG

```

Dominio CH2:

```

50
  IgG1 (SEQ ID NO: 9)
  IgG2 (SEQ ID NO: 10)
  IgG4 (SEQ ID NO: 11)
  IgG3 (SEQ ID NO: 12)
55
      ..A..   bucle   ....B....   bucle ..C...   C' bucle ...D
      240     250     260     270     280     290
      |       |       |       |       |       |
60  IgG1 PSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
    IgG2 PSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
    IgG4 PSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
    IgG3 PSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

```

```

... bucle ....E... .bucle. ...F.....bucle ..G... juntaC3
          300          310          320          330          340
|           |           |           |           |
5  IgG1 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
   IgG2 REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE
   IgG4 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
   IgG3 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE

```

10 Dominio C_{H3}:

15 IgG1 (SEQ ID NO: 13)
 IgG2 (SEQ ID NO: 14)
 IgG4 (SEQ ID NO: 15)
 IgG3 (SEQ ID NO: 16)

```

..A.. bucle ....B.... bucle ..C...C' bucle..D....
      350      360      370      380      390      400
|           |           |           |           |
20 IgG1 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
   IgG2 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS
   IgG4 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
   IgG3 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTPPVLDS

```

```

bucle ....E... .bucle. ...F... bucle ....G....
          410          420          430          440
|           |           |           |
30 IgG1 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
   IgG2 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
   IgG4 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
   IgG3 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSC SVMHEALHNHFTQKSLSLSPGK

```

35 **Propensión de agregación espacial**

40 **[0069]** La descripción en este documento se refiere a métodos para identificar regiones propensas a la agregación en una superficie de proteína y para prevenir o reducir la agregación de una proteína. Los métodos se pueden aplicar para generar inmunoglobulina con propensión a la agregación reducida, es decir, la inmunoglobulina en solución concentrada permanece principalmente en forma monomérica en lugar de multímeros agregados de orden superior. Los métodos en este documento representan un avance en la capacidad de los métodos computacionales para identificar regiones proteicas que pueden modificarse para reducir la propensión de una proteína a agregarse. En particular, los métodos se basan, al menos en parte, en el cálculo del AAD (Área Accesible por Disolvente), que se conoce en la técnica para caracterizar la superficie de una proteína. AAD proporciona el área de superficie de cada aminoácido o estructura de proteína que está en contacto con el solvente. El AAD puede calcularse normalmente calculando el lugar geométrico del centro de una esfera de sonda a medida que rueda sobre la superficie de la proteína, es decir, la superficie de un modelo estructural de proteína. La esfera de la sonda tiene el mismo radio que el de una molécula de agua, R = 1,4Å. Los métodos alternativos para calcular AAD, descritos a continuación, son conocidos en la técnica y son compatibles con los métodos descritos en este documento. Aunque AAD es bastante útil para caracterizar la superficie de la proteína, no se encontró que fuera adecuada para caracterizar los parches hidrofóbicos en la superficie de la proteína que son potencialmente propensos a la agregación debido a las siguientes deficiencias,

- 55 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 de superficie que LEU pero es menos hidrofóbica)
- 60 3. AAD no indica si varios residuos hidrofóbicos están cerca y, por lo tanto, podría mejorar la hidrofobicidad de una determinada región. Estos residuos podrían estar cerca, ya sea en la secuencia primaria o en la estructura terciaria, aunque estén lejos en la secuencia primaria. De cualquier manera, podrían mejorar la hidrofobicidad de un determinado parche en la superficie del anticuerpo.

65 **[0070]** Una medida que se describe en este documento, la AAD efectiva, se genera calculando la hidrofobicidad de

la fracción del aminoácido que se expone según la siguiente fórmula:

$$\text{AAD efectiva} = \frac{\text{AAD}}{\text{AAD completamente expuesta}} \times \text{Hidrofobicidad residual}$$

- 5
- 10 **[0071]** Una realización adicional del AAD efectiva comprende además sumar el AAD efectiva 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 aminoácidos que están adyacentes en la secuencia de proteína primaria. Aunque el AAD efectiva representa una mejora con respecto al AAD básica, sin embargo carece de la capacidad de dar cuenta completamente de la estructura de la proteína plegada y del hecho de que los aminoácidos que no están adyacentes en la secuencia proteica pueden estar próximos entre sí en la estructura plegada secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína. Dichos pliegues de proteína pueden formar regiones propensas a la agregación que no aparecen solo en la estructura primaria, o que solo pueden detectarse analizando de forma más robusta la estructura de la proteína plegada.
- 15
- 20 **[0072]** Se divulga aquí una medida nueva y más avanzada, llamada propensión a la agregación espacial, que destacará la hidrofobicidad efectiva de un cierto parche o región en la superficie de la proteína. La propensión de agregación espacial se calcula para las regiones espaciales definidas en o cerca de los átomos de un modelo estructural de proteínas.
- 25 **[0073]** En este contexto, una "región espacial definida" es un espacio o volumen tridimensional elegido para capturar una estructura física local y/o un entorno químico en o cerca de la estructura de proteína. De manera particularmente preferida, la propensión de agregación espacial se calcula para regiones esféricas con radio R centrado en átomos en una proteína (por ejemplo, átomos en un modelo estructural de proteína). La propensión de agregación espacial también puede calcularse para las regiones esféricas con radio R centrado en enlaces químicos o ubicadas en el espacio cerca del modelo estructural. En consecuencia, el SAP 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 del centro de un átomo particular o enlace químico.
- 30
- 35 **[0074]** En ciertas realizaciones de la divulgación, el radio R elegido está entre 1Å y 50 Å. Por ejemplo, el radio elegido es al menos 1Å, al menos 3Å, al menos 4Å, al menos 5Å, al menos 6Å, al menos 7Å, al menos 8Å, al menos 9Å, al menos 10Å, al menos 11Å, en al menos 12Å, al menos 15Å, al menos 20Å, al menos 25Å o al menos 30Å. Alternativamente, el radio elegido está entre 5Å y 15Å, entre 5Å y 12Å, o entre 5Å y 10Å. Por ejemplo, el radio elegido es 5Å o 10Å.
- 40 **[0075]** En otras realizaciones de la divulgación, la región para la que se calcula la propensión a la agregación espacial no es esférica. La forma posible de la región puede comprender además un cubo, un cilindro, un cono, un esferoide elíptico, una pirámide, un hemisferio o cualquier otra forma que pueda usarse para encerrar una parte del espacio. En dichas realizaciones, el tamaño de la región puede elegirse usando medidas distintas del radio, por ejemplo, la distancia desde el centro de la forma a una cara o vértice.
- 45 **[0076]** El SAP puede usarse para seleccionar residuos en una proteína, particularmente un anticuerpo o inmunoglobulina, que puede estar sustituido, aumentando así la estabilidad de la proteína. En estudios previos, dos enfoques principales para estabilizar una proteína in vitro han consistido en (1) diseñar la secuencia de proteína en sí misma e (2) incluir aditivos en la formulación líquida. Ambos enfoques se han investigado y se han obtenido resultados significativos. El primer enfoque se ha basado en el cribado de bibliotecas extensas de variantes aleatorias in silico o experimentalmente. En el segundo enfoque, el cribado de alto rendimiento para aditivos estabilizadores, así como el diseño racional de aditivos permite la identificación de formulaciones óptimas para una proteína terapéutica.
- 50 **[0077]** Se espera que la presente descripción agilice el proceso de mejora de la estabilidad identificando puntos calientes existentes para la agregación computacionalmente, y analizando variantes con sustituciones en esos sitios experimentalmente.
- 55 **[0078]** Por lo tanto, en términos generales, un método para calcular la propensión a la 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 el 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 uno o más átomos en la región espacial definida, una relación del área accesible al disolvente (AAD) de los átomos al AAD de átomos en un residuo idéntico que está completamente expuesto; (c) multiplicar cada relación por la hidrofobicidad atómica de uno o más átomos; y (d) sumar los productos de la etapa (c); por lo que la suma es el SAP para el átomo particular.
- 60
- 65

[0079] El SAP puede calcularse de acuerdo con un método diferente que comprende (a) identificar uno o más residuos de aminoácidos en un modelo estructural que representa la proteína, donde el uno o más residuos de aminoácidos tienen al menos un átomo dentro de una región espacial definida centrada en o cerca del átomo particular; (b) cálculo, para cada uno de los uno o más residuos de aminoácidos identificados, una relación del área accesible al disolvente (AAD) de átomos en el aminoácido al AAD de átomos en un residuo idéntico que está completamente expuesto; (c) multiplicar cada relación por la hidrofobicidad del uno o más residuos de aminoácidos según se determina mediante una escala de hidrofobicidad de aminoácidos; y (d) sumar los productos de la etapa (c); por lo que la suma es el SAP para el átomo particular. El modelo estructural se procesa preferiblemente antes de la etapa (a) permitiendo que el modelo estructural interactúe con el disolvente en una simulación de dinámica molecular. Cuando se identifica que un aminoácido tiene al menos un átomo dentro de la región espacial definida, se puede requerir que el al menos un átomo sea exclusivamente un átomo en una cadena lateral de aminoácido. Alternativamente, puede ser un átomo requerido para ser un átomo de la cadena principal.

[0080] En otras realizaciones de la divulgación, este método puede comprender además conducir opcionalmente una simulación de dinámica molecular antes de la etapa (a) y repetir las etapas (a) - (d), cada vez llevando a cabo una simulación de dinámica molecular adicional en una pluralidad de pasos de tiempo, produciendo así sumas múltiples como en el paso (d), y calculando el promedio de las sumas; donde el promedio calculado es el SAP para el átomo particular.

[0081] Un experto en la técnica apreciará que un método que emplea la media de valores calculados sobre una simulación de dinámica molecular será más intensivo en términos de cálculo. Tal método también proporcionará, en algunos casos, un mapa más preciso o altamente resuelto de la propensión a la agregación espacial. Sin embargo, los experimentos discutidos en este documento han demostrado que el método todavía es altamente preciso cuando no se emplea el promedio de dinámica molecular. Preferiblemente, los valores de propensión a la agregación espacial se pueden calcular para todas las estructuras de proteínas en una base de datos, por ejemplo, el Banco de Datos de Proteínas (BDP), identificando así rápidamente residuos y parches hidrófobos en todas las estructuras de proteínas conocidas. Este método permite un cribado rápido de grandes conjuntos de proteínas para identificar posibles regiones propensas a la agregación y/o sitios de interacción con proteínas.

[0082] En una aplicación preferida, la Propensión de Agregación Espacial se describe mediante la siguiente fórmula: donde:

$$SAP_{\text{átomo}} = \Sigma_{\text{Promedio de simulación}} (\Sigma_{\text{átomos dentro de R de átomo}} ((SAA-R/SAA-fe) * \text{átomo-hb}))$$

en donde:

- 1) AAD-R es AAD de átomos de cadena lateral dentro del radio R que se calcula en cada instantánea de simulación. El AAD se calcula preferiblemente en el modelo de simulación calculando el lugar geométrico del centro de una esfera de sonda a medida que rueda sobre la superficie de la proteína. La esfera de la sonda tiene el mismo radio que el de una molécula de agua, $R = 1,4\text{Å}$. Un experto en la materia apreciará que otros métodos de cálculo de la AAD serían compatibles con los métodos descritos aquí para calcular SAP. Por ejemplo, el AAD puede calcularse solo en átomos de cadena lateral de aminoácidos. El AAD también puede calcularse solo en átomos de cadena principal de aminoácidos (es decir, aquellos átomos del esqueleto del péptido e hidrógenos asociados). Alternativamente, el AAD puede calcularse solo en átomos de cadena principal de aminoácidos con la exclusión de hidrógenos asociados;
- 2) AAD-fe es AAD de cadena lateral de residuo completamente expuesto (digamos para el aminoácido 'X') que se obtiene preferiblemente calculando el AAD de cadenas laterales del residuo medio en la conformación completamente extendida del tripéptido 'Ala-X-Ala'; y
- 3) átomo-hb es *hidrofobicidad de átomo* que se obtiene como se describió anteriormente usando la escala de hidrofobicidad de Black y Mold (Black y Mould, Anal. Biochem. 1991, 193, 72-82). La escala está normalizada de tal manera que la glicina tiene una hidrofobicidad de cero. Por lo tanto, los aminoácidos que son más hidrófobos que la glicina son positivos y menos hidrofóbicos que la glicina, son negativos en la escala hidrofóbica.

[0083] 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 manera que un cálculo de AAD en un residuo de este tipo, X, proporcionará el área accesible a solvente máxima disponible. En consecuencia, se contempla que otros residuos además de alanina se pueden usar en el cálculo sin alterar o alterar por completo los resultados.

[0084] Como se describió anteriormente, los métodos de la presente descripción se pueden aplicar a cualquier modelo estructural de proteína que incluye una estructura de rayos X usando la misma fórmula que anteriormente.

[0085] De manera similar, si la estructura de rayos X no está disponible, el mismo parámetro de propensión de

agregación espacial puede aplicarse a la estructura generada a través del modelado de homología, y el parámetro SAP puede calcularse usando la misma fórmula que anteriormente.

[0086] En ciertas realizaciones de la divulgación, la propensión de agregación espacial se calcula para todos los átomos en un modelo estructural de proteína. En algunas realizaciones de la divulgación, los valores atómicos de propensión a la agregación espacial pueden promediarse sobre cada residuo de proteína individual, o sobre pequeños grupos de residuos.

Usos de la metodología SAP

[0087] En un aspecto, la presente divulgación se puede usar como se describió anteriormente para identificar residuos de aminoácidos hidrófobos, regiones o parches en una proteína. Sin querer mantener valores umbrales específicos, los átomos o residuos de aminoácidos que tienen una propensión a la agregación espacial > 0 se consideran hidrofóbicos o están en una región propensa a la agregación. Dependiendo del tipo de proteína, la estructura particular y el solvente en el que existe, puede ser deseable identificar átomos o residuos usando un punto de corte que sea ligeramente inferior a cero, por ejemplo, eligiendo átomos o residuos que tengan una agregación espacial -propensidad de más de $-0,1$, $-0,15$, $-0,2$, etc. Alternativamente, quizás sea deseable emplear un límite más estricto, por ejemplo, 0 , $0,05$, $0,1$, $0,15$, $0,2$, etc., para elegir los átomos hidrofóbicos más fuertes, residuos o parches. Además, ya que el algoritmo proporciona números más altos a los residuos en el centro de un parche, los residuos dentro de 3A, 4A, 5A, 7,5A o 10A del residuo que cumple el límite también pueden seleccionarse para la mutación a menos residuos hidrófobos para reducir la agregación. Puede ser ventajoso simplemente seleccionar átomos o residuos que tengan una propensión a la agregación espacial que sea mayor que los átomos o residuos que estén cerca ya sea secuencialmente (es decir, a lo largo de la secuencia de la proteína) o, preferiblemente, espacialmente (es decir, en la estructura tridimensional). Un método preferido para seleccionar átomos o residuos en un parche hidrofóbico consiste en mapear los valores calculados de propensión-agregación espacial, por ejemplo, usando un código de color o codificación numérica, sobre el modelo estructural de proteína del que se derivaron, visualizando así las diferencias en Espacial-Agregación-Propensidad a través de la superficie de la proteína y, por lo tanto, permite una fácil selección de parches o residuos hidrófobos. Preferiblemente, los cálculos para la propensión a la agregación espacial se llevan a cabo por separado usando dos valores elegidos para el radio, uno de mayor resolución, por ejemplo, 5A, y uno de menor resolución, por ejemplo, 10A. En tal realización de la divulgación, pueden verse parches hidrófobos más grandes o más amplios en la estructura de la proteína con el mapa de resolución más baja. Una vez seleccionados los parches hidrofóbicos de interés en el mapa de baja resolución, esos parches pueden verse con mayor detalle en el mapa de resolución más alta que puede permitir a un experto en la técnica elegir más fácilmente o con mayor precisión residuos para mutación o modificación. Por ejemplo, cuando se visualiza un parche hidrofóbico en el mapa de mayor resolución, puede ser deseable seleccionar la mutación del residuo que tiene la puntuación más alta de SAP o es el más hidrofóbico (p. ej., el residuo más hidrofóbico en el parche de acuerdo con la escala de Black y Mould, Anal. Biochem. 1991, 193, 72 - 82).

[0088] Se describe aquí un método para identificar una región propensa a la agregación en una proteína que comprende (a) mapear sobre el modelo estructural el SAP calculado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en este documento para átomos en la proteína; e (b) identificar una región dentro de la proteína que tiene una pluralidad de átomos que tienen un SAP > 0 ; en donde la región propensa a la agregación comprende los aminoácidos que comprenden dicha pluralidad de átomos. En tal método, el SAP puede calcularse para todos los átomos en una proteína o una porción de los átomos. Se contempla que solo se puede calcular el SAP para residuos particulares o grupos de residuos que son de interés.

[0089] Puede ser informativo trazar los puntajes de SAP de los átomos (o la puntuación de SAP promediada sobre residuos de aminoácidos). Tal diagrama que muestra el puntaje de SAP a lo largo de los átomos o residuos de una proteína permite la fácil identificación de los picos, que pueden indicar candidatos para el reemplazo. Preferiblemente, las puntuaciones de SAP a lo largo de los átomos o residuos en la proteína se trazan en un gráfico y el área bajo la curva (AUC) se calcula para los picos en el gráfico. En dicho método, los picos con una AUC más grande representan regiones propensas a la agregación más grandes o más hidrofobas. En realizaciones particulares de la divulgación, será deseable seleccionar el reemplazo de uno o más residuos que se identifican como existentes en un pico, o, más preferiblemente, en un pico con un AUC grande.

[0090] Los métodos descritos en este documento pueden usarse para preparar una variante de inmunoglobulina que exhibe una propensión reducida a la agregación reemplazando al menos un residuo de aminoácido dentro de una región propensa a la agregación en la inmunoglobulina identificada por cualquiera de los métodos descritos aquí con un aminoácido residuo que es más hidrófilo que el residuo que se está reemplazando, de modo que se reduce la propensión a la agregación de la variante. Como se usa en el presente documento, cuando los residuos de aminoácidos se denominan "más" o "menos" hidrófilos o hidrófobos, el experto en la técnica apreciará que esto significa más o menos hidrófobo en comparación con otro aminoácido de acuerdo con una medida de hidrofobicidad (hidrofilicidad) conocida en la técnica, por ejemplo, la escala de hidrofobicidad de Black y Mold.

[0091] De forma similar, los métodos descritos en este documento pueden usarse para preparar una variante de

inmunoglobulina que muestra una propensión reducida a la agregación generando una pluralidad de variantes de inmunoglobulina reemplazando, en cada variante, al menos un residuo dentro de una región propensa a la agregación en la inmunoglobulina, en donde la región propensa a la agregación se identifica usando puntajes SAP calculados de acuerdo con cualquier método descrito aquí, en donde uno o diferentes residuos, o diferentes combinaciones de residuos se reemplazan en cada variante, y donde al menos un residuo se reemplaza con un residuo que es más hidrofílico; y (b) seleccionar una variante de inmunoglobulina preparada como en (a) que exhibe una propensión reducida a la agregación.

[0092] Además, un residuo de aminoácido en una región propensa a la agregación puede eliminarse en lugar de reemplazarse. En algunas inmunoglobulinas en las que se seleccionan múltiples residuos de aminoácidos para su reemplazo, algunos residuos pueden reemplazarse mientras que otros se eliminan.

[0093] Se pueden identificar regiones o residuos propensos a la agregación múltiple en una inmunoglobulina inicial mediante los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, usando un punto de corte de propensión a la agregación espacial por encima del cual se seleccionan los residuos). Posteriormente, se puede generar una pluralidad de variantes de inmunoglobulina reemplazando en dicha inmunoglobulina inicial uno o más restos de aminoácidos seleccionados (o uno o más residuos que caen en el parche seleccionado) con residuos de aminoácidos que son más hidrófilos, de modo que se crea una pluralidad de variantes de inmunoglobulinas que representan una variedad de diferentes sustituciones de aminoácidos. A continuación, esta población puede cribarse para seleccionar una o más variantes de inmunoglobulina que tienen una propensión reducida a la agregación. Un experto en la materia apreciará que pueden identificarse regiones propensas a la agregación múltiple, y que una o más sustituciones y/o deleciones pueden realizarse en una o más regiones propensas a la agregación. La hidrofobicidad relativa de los aminoácidos se puede determinar mediante la escala de hidrofobicidad de Black y Mold como se describió anteriormente. En realizaciones específicas, un aminoácido a reemplazar se selecciona del grupo que comprende o consiste en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met, Pro, Cys, Ala o Gly. En realizaciones relacionadas, el aminoácido más hidrófilo que se sustituirá en la inmunoglobulina se elegirá del grupo que comprende o que consiste en Thr, Ser, Lys, Gln, Asn, His, Glu, Asp y Arg.

[0094] Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar formulaciones que comprenden inmunoglobulinas modificadas y/o aisladas que tienen una propensión reducida a la agregación que comprende al menos una mutación reductora de la agregación en un residuo en un dominio conservado de la inmunoglobulina que (i) tiene una propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) de al menos 0,15, o (ii) tiene una propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) superior a 0,0 y está dentro de los 5Å de un residuo que tiene una propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) de al menos 0,15, donde la al menos una mutación reductora de agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que disminuye la propensión de agregación espacial (esfera de radio 5Å) del residuo en comparación con la inmunoglobulina no mutada y la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores que tienen una segunda mutación reductora de la agregación, la mutación reductora de la agregación y la segunda mutación reductora de la agregación están en diferentes motivos de agregación. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un resto de aminoácido que es menos hidrófobo que el residuo en la inmunoglobulina no modificada. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, glutamato, aspartato, glutamina y asparagina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de lisina. La propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) puede calcularse usando la escala de hidrofobicidad del molde negro normalizada de modo que la glicina sea igual a 0. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1, una IgG2 y una IgG3, o una IgG4. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina es una IgG1. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H1} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H2} humano. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_{H3} humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene un dominio C_L humano. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina tiene una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos un cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, la solución líquida concentrada está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml.

[0095] Las variantes de inmunoglobulina se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica que incluya mutagénesis dirigida al sitio y otra tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, véase la patente de

EE.UU. N^{os} 5284760; 5556747; 5789166; 6878531,5932419; y, 6391548.

5 **[0096]** Los métodos descritos en este documento pueden usarse para preparar una variante de inmunoglobulina que exhibe una propensión reducida a la agregación al reemplazar al menos un residuo de aminoácido dentro de una región propensa a la agregación en la inmunoglobulina identificada por cualquiera de los métodos descritos aquí 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 es más hidrofílico que el residuo que se está reemplazando, de modo que se reduce la propensión a la agregación de la variante.

10 **[0097]** La síntesis de aminoácidos no naturales es conocida por los expertos en la técnica, y se describe adicionalmente, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N^o 2003-0082575. En general, se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para sintetizar o incorporar aminoácidos no naturales, modificados o inusuales en proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos o referenciados en las publicaciones Liao J. Biotechnol Prog. 2007 de enero a febrero; 23 (1): 28 - 31; Rajesh e Iqbal. Curr Pharm Biotechnol. Aug 2006; 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 y otros, Glycoconj J. 2005 Mar; 22 (3): 83-93. Como un ejemplo adicional, la tecnología Ambrx ReCODE™ puede emplearse para desarrollar e incorporar aminoácidos no naturales, o aminoácidos inusuales en las proteínas como se indica por los métodos descritos en este documento.

20 **[0098]** Las variantes de inmunoglobulina en las formulaciones de acuerdo con la invención pueden exhibir una estabilidad mejorada como se determina, por ejemplo, mediante estudios de estabilidad acelerada. Los ejemplos de estudios de estabilidad acelerada incluyen, entre otros, estudios que muestran temperaturas de almacenamiento incrementadas. Una disminución en la formación de agregados observada para una variante de inmunoglobulina en comparación con la proteína de tipo salvaje o inicial indica una estabilidad aumentada. La estabilidad de las variantes de inmunoglobulina también se puede probar midiendo el cambio en la transición de la temperatura de fusión de una variante en comparación con la inmunoglobulina de tipo salvaje o inicial. En dicha realización, una mayor estabilidad sería evidente como un aumento en la transición de la temperatura de fusión en la variante. Métodos adicionales para medir la agregación de proteínas se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N^o 2003/0022243.

30 **[0099]** Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican inmunoglobulinas modificadas como se describe en los párrafos [0066], [0067] o [0096] y cualquiera y todas las combinaciones de sus realizaciones. En ciertas realizaciones, el polinucleótido está en un vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, un promotor inducible se une operativamente al polinucleótido. Otro aspecto incluye células anfitrionas con el vector de cualquiera de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras son capaces de expresar la inmunoglobulina codificada por el polinucleótido.

40 **[0100]** Por consiguiente un objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos para producir una inmunoglobulina con una propensión a la agregación reducida que comprende proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula huésped del párrafo anterior y colocar el medio de cultivo en condiciones en las que la inmunoglobulina es expresado. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen una etapa adicional de aislamiento de la inmunoglobulina expresada.

50 **[0101]** En otro aspecto, la propensión de agregación espacial calculada puede usarse para identificar sitios de interacción proteína-proteína en la superficie de una estructura de proteína. Se sabe en la técnica que los sitios de interacción de proteínas a menudo contienen residuos hidrófobos o parches hidrófobos. Se espera que los métodos descritos en este documento sean útiles para localizar sitios de unión mediante la identificación de parches hidrófobos. Dichos parches hidrofóbicos serán entonces candidatos para sitios de reconocimiento proteína-proteína o proteína-ligando.

60 **[0102]** La divulgación se refiere además a un código informático para determinar SAP de acuerdo con los métodos descritos en este documento. La divulgación también se refiere a una computadora, un superordenador o grupo de computadoras dedicadas a realizar los métodos descritos en este documento. En otro aspecto, se describe un servicio basado en web, basado en servidor o basado en Internet para determinar regiones propensas a la agregación en una proteína, comprendiendo el servicio la aceptación de datos sobre una proteína (por ejemplo, un modelo estructural de proteína) de un usuario (p. ej., a través de Internet) o recuperar dichos datos de una base de datos de manera que el proveedor de servicios pueda generar, recuperar o acceder a una estructura estática de la proteína, incluyendo opcionalmente el modelado de dinámica molecular de la proteína para proporcionar una estructura dinámica de la proteína, determinando SAP para átomos o residuos de la proteína en función de la estructura estática o dinámica así generada, y devolver los datos de SAP, por ejemplo, como un modelo estructural mapeado con dichos datos de SAP por el proveedor del servicio, a un usuario. El usuario puede ser una persona. Alternativamente, el usuario es un sistema de computadora o un algoritmo de computadora automatizado.

[0103] Aquí también se divulga un sistema de cálculo de SAP que comprende: un servidor web para proporcionar un servicio web para calcular SAP a un terminal de usuario a través de Internet; una base de datos para almacenar información general sobre el método de cálculo, hidrofobicidad de aminoácidos, etc., y un servidor de cálculo para realizar el cálculo de SAP basado en información en la base de datos e información proporcionada o transmitida a través de Internet por el usuario.

[0104] En algunas realizaciones de la divulgación, el servidor web y el servidor de cálculo son el mismo sistema informático. En algunas realizaciones de la divulgación, el sistema informático es una supercomputadora, una computadora de clúster o una única estación de trabajo o servidor. En una realización relacionada de la divulgación, el servidor web del sistema de cálculo SAP comprende además un controlador para controlar toda la operación, una unidad de conexión de red para conexión a Internet y una unidad de servicio web para proporcionar un servicio web para calcular SAP al terminal de usuario conectado a través de Internet.

[0105] Además, la presente divulgación se refiere además a productos de almacenamiento informático con un medio legible por ordenador que contiene código de programa para realizar diversas operaciones implementadas por ordenador, por ejemplo, calcular el SAP para un modelo estructural, calcular el AAD, calcular el AAD efectivo, manipular modelos estructurales, implementar simulaciones de dinámica molecular, organizar y almacenar datos relevantes, o realizar otras operaciones descritas aquí. El medio legible por computadora es cualquier dispositivo de almacenamiento de datos que puede almacenar datos que luego pueden leerse en un sistema informático. Los ejemplos de medios legibles por computadora incluyen, entre otros, discos duros, disquetes, unidades de memoria flash, discos ópticos (por ejemplo, CD, DVD, HD-DVD, discos Blu-Ray, etc.) y dispositivos de hardware especialmente configurados, como circuitos integrados específicos de aplicaciones (ASIC) o dispositivos lógicos programables (PLD). El medio legible por ordenador también se puede distribuir como una señal de datos incorporada en una onda portadora sobre una red de sistemas informáticos acoplados de modo que el código legible por ordenador se almacena y se ejecuta de una manera distribuida. Los expertos en la técnica apreciarán que los elementos de hardware y software descritos anteriormente son de diseño y construcción estándar. Las realizaciones relacionadas con la computadora, Internet, servidor y servicio de la divulgación descrita anteriormente pueden aplicarse además a la AAD y la AAD efectiva, así como a SAP.

Composiciones farmacéuticas que contienen inmunoglobulinas y variantes de inmunoglobulinas

[0106] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o más variantes de inmunoglobulina producidas por los métodos de la invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una inmunoglobulina de la presente invención combinada con al menos otro agente anticancerígeno.

[0107] Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, la inmunoglobulina o variante del mismo de la invención, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

[0108] 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., y colaboradores (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, hidroyódico, fósforo y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono-alifáticos y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos de fenilo sustituido, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

[0109] Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

5 [0110] Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

10 [0111] Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

15 [0112] Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

20 [0113] Las formulaciones ejemplares comprenden al menos una variante de inmunoglobulina de la invención y pueden comprender concentraciones menores de agentes estabilizantes (o desagregación) que, además de los métodos descritos en la presente memoria, pueden usarse para prevenir o disminuir la agregación de una inmunoglobulina. Por consiguiente, los métodos convencionales usados para evitar la agregación se pueden emplear en el desarrollo de composiciones farmacéuticas que contienen variantes de inmunoglobulina producidas por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, se puede incluir una variedad de compuestos estabilizantes o desagregantes en composiciones farmacéuticas de la invención dependiendo de su uso previsto y su toxicidad biológica. Tales compuestos estabilizantes pueden incluir, por ejemplo, ciclodextrina y sus derivados (Patente de Estados Unidos N° 5730969), composiciones de alquilglucósido (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2007/0111938), el uso de moléculas de chaperona (por ejemplo, LEA (Goyal et al., Biochem J. 2005, 388 (Pt 1): 151-7, los métodos de la Patente de Estados Unidos N° 5688651), compuestos de betaina (Xiao, Burn, Tolbert, Bioconjug Chem. 2008 23 de mayo), tensioactivos (por ejemplo, Pluronic F127, Pluronic F68, Tween 20 (Wei y col., International Journal of Pharmaceutics, 2007, 338 (1-2): 125-132)), y los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos N°s 5696090, 5688651 y 6420122.

25 [0114] Además, las proteínas, y en particular los anticuerpos, se estabilizan en formulaciones usando combinaciones de diferentes clases de excipientes, por ejemplo, (1) disacáridos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa) o polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol) actúan como estabilizantes por exclusión preferencial y también pueden actuar como crioprotectores durante la liofilización, (2) tensioactivos (por ejemplo, Polysorbat 80, Polysorbat 20) actúa minimizando las interacciones de proteínas en interfaces como líquido/hielo, líquido/superficie de material y/o interfaces líquido/aire y (3) tampones (por ejemplo, fosfato, citrato, histidina) ayudan a controlar y mantener el pH de la formulación. Por consiguiente, dichos disacáridos polioles, tensioactivos y tampones se pueden usar además de los métodos de la presente invención para estabilizar adicionalmente inmunoglobulinas y evitar su agregación.

30 [0115] Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, 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 de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

35 [0116] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización (liofilización) que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada.

5 **[0117]** La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **[0118]** Por consiguiente, un objeto de la presente descripción consiste en proporcionar formulaciones de inmunoglobulinas modificadas que pueden estar compuestas de inmunoglobulinas modificadas como se describe en los párrafos [0066], [0067] o [0096] y todas y cada una de las combinaciones de sus realizaciones a una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregados después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

35 **[0119]** Por consiguiente, un objeto de la presente descripción consiste en proporcionar usos de las inmunoglobulinas modificadas como se describe en los párrafos [0066], [0067] o [0096] y todas y cada una de las combinaciones de sus realizaciones como un ingrediente activo farmacéutico no agregante.

40 **[0120]** Por consiguiente, un objeto de la presente descripción consiste en proporcionar composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina modificada como se describe en los párrafos [0066], [0067] o [0096] y cualquiera y todas las combinaciones de sus realizaciones y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina está en una concentración de 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 está en una concentración mayor que la concentración a la que la inmunoglobulina no mutada se agrega consigo misma en una solución líquida concentrada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, 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 en al menos el noventa y nueve por ciento de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado. En ciertas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos un treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con las realizaciones anteriores, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

60 **[0121]** Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La especificación para las formas de unidades de dosificación está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

5
[0122] Para la administración de la inmunoglobulina, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación preferidos para una inmunoglobulina de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes esquemas de dosificación: 10
15 (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

[0123] Alternativamente, una inmunoglobulina de la invención se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían según la vida media de la sustancia administrada en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

[0124] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y como factores bien conocidos en las artes médicas.

[0125] Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de inmunoglobulina de la invención preferiblemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de deterioro o discapacidad debida a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición in vitro mediante ensayos conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

[0126] Una composición de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de la administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para restos de unión de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en la presente memoria significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, inyección e infusión transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

[0127] Alternativamente, una inmunoglobulina de la invención se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasalmente,

oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

[0128] Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de vinilo de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

[0129] Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; Patente de los Estados Unidos N° 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de los Estados Unidos N° 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para suministrar medicamentos a una tasa de infusión precisa; Patente de los Estados Unidos N° 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; Patente de los Estados Unidos N° 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos que tiene compartimentos de cámaras múltiples; y la Patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos.

[0130] Aquí se describen métodos para reducir la propensión a la agregación de una inmunoglobulina en una formulación farmacéutica altamente concentrada que comprende proporcionar una inmunoglobulina que es propensa a la agregación; sustituir un residuo en un dominio conservado de la inmunoglobulina que (i) tiene una propensión a la agregación espacial de al menos 0,15, o (ii) tiene una propensión a la agregación espacial (esfera de radio de 5Å) mayor que 0,0 y está dentro de 5Å de un residuo que tiene una propensión a la agregación espacial de al menos 0,15, con un resto de aminoácido que reduce la propensión de agregación espacial (esfera de radio de 5Å) y genera una formulación líquida altamente concentrada de la inmunoglobulina modificada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es de 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 en donde la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada.

[0131] Aquí se describen usos de las inmunoglobulinas modificadas como se describe en los párrafos [0066], [0067] o [0096] y cualquiera y todas las combinaciones de sus realizaciones en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada en la que la concentración de inmunoglobulina modificada es 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 la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de la médula ósea; pérdida de hueso; Enfermedad de Paget, osteoclastoma; cáncer de mama; osteopenia de desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa poliostótica, reconstrucción periodontal y fracturas óseas; sarcoidosis; cánceres de hueso osteolítico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer de recto; metástasis óseas, manejo del dolor óseo e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes, infecciones virales, neoplasias hematológicas y afecciones de tipo neoplásico, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, fungoide de micosis, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmática), tumores de células precursoras linfocíticas, incluida la leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células B, y leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluidas las leucemias de células T periféricas, leucemia de células T adultas/linfomas de células T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides como leucemias mielógenas agudas, incluida la AML con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluida la leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, p. ej., tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma basocelular, cáncer de páncreas, cáncer de vías biliares, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, cáncer uterino, vaginal o cervical, cáncer de ovario, cáncer primario de hígado o cáncer endometrial, y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondiloartritis, artritis reumatoide, enfermedades

inflamatorias del intestino (IBD), sepsis y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, scleroderma, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de injerto de islotes alogénicos, neoplasias hematológicas, como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia mielógena aguda (AML), inflamación asociada con tumores, lesión del nervio periférico o enfermedades desmielinizantes. El uso del medicamento es para el tratamiento de psoriasis en placas, colitis ulcerosa, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer colorrectal, artritis idiopática juvenil, degeneración macular, virus respiratorio sincitial, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, osteoporosis, pérdida ósea inducida por el tratamiento, metástasis óseas, mieloma múltiple, enfermedad de Alzheimer, glaucoma y esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uso del medicamento comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la inmunoglobulina en el medicamento muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos treinta y cinco por ciento, al menos un cuarenta por ciento o al menos un cincuenta por ciento menos de agregados después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones, la agregación se mide mediante SEC-HPLC. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento está sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

EJEMPLOS

[0132] Las técnicas de simulación molecular para predecir regiones propensas a la agregación y estudiar el mecanismo de agregación han empleado principalmente modelos de simulación comparativamente simples (Ma y Nussinov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10, 445-452; Cellmer, et. al., *TRENDS in Biotechnology* 2007, 25 (6), 254) a diferencia de los modelos atomísticos detallados que se pueden emplear en la presente invención. El menos detallado de los modelos de simulación empleados fue el modelo reticular, que se usó en numerosos estudios de agregación de proteínas (Harrison y otros, *J. Mol. Biol.* 1999, 286,593-606; Dima y Thirumalai, *Protein Sci.* 2002, 11, 1036 -1049; Leonhard et al., *Protein Sci.* 2004, 13, 358-369; Patro y Przybycien, *Biophys. J.* 1994, 66, 1274-1289; Patro y Przybycien, *Biophys. J.* 1996, 70, 2888-2902; Broglia y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1998, 95, 12930 - 12333; Istrail y col., *Comput. Biol.* 1999, 6, 143 - 162; Giugliarelli y col., *Chem. Phys.* 2000, 113, 5072-5077; Bratko y col., *J. Chem. Phys.* 2001, 114, 561 - 569; Bratko y Blanch J. *Chem. Phys.* 2003, 118, 5185 - 5194; Combe y Frenkel *Chem. Phys.* 2003, 118, 9015-9022; Toma y Toma, *Biomacromolecules* 2000, 1, 232 - 238; Gupta y col., *Protein Sci.* 1998, 7, 2642 - 2652, y Nguyen y Hall *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 80, 823 - 834). Aquí cada residuo se representa como un cordón que ocupa un único sitio en una red tridimensional. Debido a su simplicidad, el modelo de celosía es menos exigente desde el punto de vista informático y se ha utilizado para simular sistemas grandes durante escalas de tiempo prolongadas. Aunque estos modelos reticulares proporcionan información sobre la física básica subyacente a la agregación de proteínas, no representan con exactitud la estructura secundaria y terciaria, y no pueden explicar adecuadamente las diferentes interacciones a nivel atomístico, como los enlaces de hidrógeno.

[0133] Un modelo más detallado en comparación con el modelo reticular es el modelo de resolución intermedia en el que unos pocos átomos se combinan habitualmente en un solo cordón, y los pseudo-enlaces a veces se introducen para mantener los ángulos de enlace de la estructura y los estados de isomerización (Smith y Hall, *Mol. Biol.* 2001, 312, 187 - 202; Smith y Hall, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 2001, 44, 344 - 360; Smith y Hall, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 2001, 44, 376 - 391; Nguyen, et al., *Protein Sci.* 2004, 13, 2909 - 2924; Nguyen y Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2004, 101 (46), 16180 - 16185; Nguyen. y Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 1890 - 1901; Jang, y col., *Biophys. J.* 2004, 86, 31 - 49; Jang, y col., *Protein Sci.* 2004, 13, 40 - 53). Este modelo se utilizó con éxito para simular la formación de fibrillas a partir de sistemas que contienen entre 12 y 96 péptidos de polialanina (16 residuos cada uno) a partir de un estado aleatorio (Nguyen y Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2004, 101 (46), 16180 - 16185; Nguyen y Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 1890 - 1901). Dokholyan y colaboradores aplicaron dicho modelo para estudiar la formación de estructuras de hoja β fibrilar por ocho proteínas de dominio SH3 Src modelo (Ding, et al., *Mol. Biol.* 2002, 324, 851-857) o por 28 péptidos β de modelo A (1 - 40) (Peng, y col., *Phys. Rev. E: Stat. Ph. Interdiscip. Top.* 2004, 69, 41908 - 41914).

[0134] A diferencia de los modelos más simples, los modelos atomísticos incluyen todos los detalles atomísticos, como los enlaces de hidrógeno, y por lo tanto son más precisos que los modelos de red o de resolución intermedia. Dichos modelos atomísticos se han usado con un disolvente explícito o con un disolvente implícito en el que el disolvente se trata como un continuo. El modelo explícito es más preciso que el modelo implícito, pero también es más exigente desde el punto de vista informático. Tal modelo atomístico con disolvente implícito se usó para estudiar las primeras etapas de agregación del heptapéptido GNNQQNY (SEQ ID N°: 17), que es una parte de la proteína de levadura Sup35 (Gsoner, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2003, 100, 5154 - 5159). Un modelo similar se usó para la agregación del péptido amiloide Ab16-22 (KLVFFAE (SEQ ID NO: 18)) en hojas β antiparalelas (Klimov y Thirumalai, *Structure* 2003, 11, 295-307). Dokholyan y colaboradores (Khare, et al., *Proteins.* 2005, 61, 617-632.) Utilizaron un modelo atomístico explícito para investigar la propensión de agregación ordenada a lo largo de la secuencia de la enzima Cu, Zn dismutasa superóxida (SOD1). Han descompuesto la secuencia de SOD1 en heptapéptidos superpuestos y han realizado una gran cantidad de simulaciones explícitas de dinámica molecular de

agua (cada una de 0,5 ns) de segmentos monoméricos, diméricos y tetraméricos. Con esto identificaron las regiones amiloidogénicas en la secuencia SOD1 que son: los dos extremos, las cadenas β 4 y 7, y los dos bucles de cruce.

5 **[0135]** Se desarrolló un protocolo de simulación de dinámica molecular similar para obtener información estructural sobre la agregación β ordenada de polipéptidos amiloidogénicos (Cecchini y col., J Mol Biol. 2006, 357, 1306-1321). El procedimiento se basa en la descomposición de una cadena polipeptídica en segmentos superpuestos y simulaciones de dinámica molecular de equilibrio (MD) de un pequeño número de copias de cada segmento. Se encontró que la propensión a la agregación β a lo largo de la secuencia del péptido A β de Alzheimer (1-42) era altamente heterogénea con un máximo en el segmento V₁₂HHQKLVFFAE₂₂ (SEQ ID NO: 19) y mínimo en cuatro dipéptidos similares a espirales. Usando esta técnica, el cambio predicho en la propensión de agregación de un mutante de punto doble del dominio N-terminal del prión de levadura Ure2p se verificó in vitro usando el ensayo de unión a tioflavina T. Tal procedimiento para descomponer la cadena polipeptídica en segmentos superpuestos sería extremadamente desafiante para sistemas tales como anticuerpos debido a su gran tamaño. Incluso una simulación atomística de un solo anticuerpo completo en disolvente explícito es muy exigente desde el punto de vista informático debido al enorme tamaño de un anticuerpo. Por lo tanto, no parece haber una simulación atomística de anticuerpos completa en la literatura.

20 **[0136]** Sin embargo, se han realizado simulaciones atomísticas de pequeñas partes del anticuerpo, principalmente para el fragmento Fab (Noon, y col., PNAS 2002, 99, 6466; Sinha y Smith-Gill, Cell Biochemistry and Biophysics. 2005, 43, 253). En el trabajo divulgado aquí, se realizaron simulaciones atomísticas de una molécula de anticuerpo completa con un disolvente explícito. En base a estas simulaciones, las regiones propensas a la agregación en el anticuerpo se identificaron usando el parámetro "Propagación de la agregación espacial" descrito en este documento. Estas regiones propensas a la agregación se mutaron luego para diseñar anticuerpos con estabilidad mejorada. Los ejemplos descritos en la presente memoria se refieren a realizaciones particulares, no limitantes, de la invención.

Ejemplo 1: Metodología de simulación de dinámica molecular

30 **[0137]** Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para un anticuerpo completo usando un modelo de todos los átomos. La estructura inicial para la simulación del anticuerpo completo se obtuvo a partir de las estructuras de rayos X de los fragmentos Fab y Fc individuales. La estructura de rayos X de un fragmento Fab de prueba de concepto (POC) se seleccionó para modelar sobre la estructura de rayos X de Fc obtenida a partir del anticuerpo IgG1 1HZH (Saphire et al., Science, 2001, 293, 1155). Se eligió 1HZH ya que la estructura de rayos X es conocida por el anticuerpo completo y dado que la estructura de Fc es la misma para todos los tipos de anticuerpos IgG1. La estructura de un anticuerpo POC completo se obtuvo entonces alineando los fragmentos Fab y Fc usando la estructura 1HZH como una plantilla modelo. Con el fin de alinear los fragmentos a la distancia y orientación correctas, se minimizó la RMSD (Desviación cuadrática media de la raíz) entre los residuos CYS comunes de los fragmentos y la plantilla completa del anticuerpo (1HZH). Los restos CYS se eligieron porque cada subdominio de anticuerpo (C_{H1}, C_{H2}, etc.) contiene un enlace disulfuro y, por lo tanto, los restos CYS están ampliamente distribuidos en toda la estructura del anticuerpo. La estructura completa del anticuerpo resultante se usó a continuación para realizar simulaciones explícitas de átomos durante 30ns. Se usó un patrón de glicosilación G0 para las simulaciones ya que este es el patrón de glicosilación más común observado en los anticuerpos.

45 **[0138]** El paquete de simulación CHARMM (Brooks y col., J. Comput. Chem., 1983, 4, 187) se usó para la configuración y el análisis, y el paquete NAMD (Phillips y otros, Journal of Computational Chemistry. 2005, 26, 1781) para realizar simulaciones. El campo de fuerza totalmente atomístico CHARMM (MacKerell y col., J. Phys Chem. B. 1998, 102, 3586) se usó para la proteína y el disolvente TIP3P (Jorgensen y col., J. Chem. Phys., 1983, 79, 926). modelo de agua. Las simulaciones se realizaron a 298 K y latm en el conjunto NPT. Los parámetros para los grupos de azúcar implicados en la glicosilación del fragmento Fc se derivaron para ser consistentes con el campo de fuerza CHARMM, siguiendo el campo de fuerza CSFF (Kuttel y col., J. Comput. Chem., 2002, 23, 1236). Los estados de protonación de los residuos de Histidina a pH-7 se eligieron en función de la proximidad espacial de los grupos electro-negativos. El anticuerpo completo se solvó en una caja ortorrómbica ya que esto minimiza la cantidad de moléculas de agua requeridas y, por lo tanto, minimiza el tiempo de cálculo. Se usaron condiciones de contorno periódicas en las 3 direcciones. Se usó una capa de solvatación de agua de 8 Å en cada dirección de la caja ortorrómbica. El tamaño del sistema total resultante fue 202130 átomos. Se agregaron iones suficientes para neutralizar la carga total del sistema. La neutralidad de carga es requerida por la técnica de suma de Ewald empleada para calcular la contribución de las interacciones electrostáticas en el sistema.

60 **[0139]** Después de que el anticuerpo se solvató, la energía se minimizó inicialmente con SD (descensos en pendiente) fijando la proteína para permitir que el agua se relaje alrededor de la proteína. Luego se eliminaron las restricciones y la estructura se minimizó aún más con SD y ABNR (base adoptada Newton-Raphson). Luego, el sistema se calentó lentamente a temperatura ambiente con un incremento de 5°C cada 0,5 ps utilizando un paso de tiempo 1fs. El sistema luego se equilibró para 1ns antes de calcular las propiedades de interés de la simulación. Las configuraciones se guardaron cada 0,1ps durante la simulación para un análisis estadístico adicional.

Ejemplo 2: Cálculo de la propensión de agregación espacial (SAP)

[0140] Con el fin de superar las deficiencias de AAD, se definió un nuevo parámetro llamado "*propensión de agregación espacial*" como se describió anteriormente.

[0141] En este ejemplo, se calculó la "propensión a la agregación espacial" para regiones esféricas con radio R centrado en cada átomo en el anticuerpo descrito en el ejemplo 1. El valor de propensión a la agregación espacial se evaluó con un promedio de simulación de 30ns. para el fragmento Fc del anticuerpo para dos radios diferentes de parches (R = 5 Å, 10 Å) (Un experto en la materia apreciará que se pueden elegir varios pasos de tiempo para la simulación de acuerdo con los recursos computacionales disponibles y la resolución deseada del resultado). En ambos casos, se observó que la mayoría de los valores eran negativos, lo que indica que las regiones más expuestas son hidrofílicas. Esto fue como se esperaba ya que la mayor parte de la superficie de la proteína expuesta suele ser hidrófila. También se observó que hay algunas regiones con picos positivos para la propensión a la agregación espacial que indican alta hidrofobicidad expuesta. Pasar de radios inferiores de parches (5 Å) a los radios superiores (10 Å) elimina algunos picos, mientras que otros picos se mejoran. Se eliminaron algunos picos porque en estas regiones un parche hidrofóbico pequeño (con un radio inferior a 5Å) está rodeado por parches hidrófilos; por lo tanto, promediar más de 10 Å conduce a una disminución efectiva de la hidrofobicidad para la región. Mientras que en algunas otras regiones, la propensión a la agregación espacial a R = 10 Å aumenta debido a parches hidrofóbicos que rodean un parche hidrofóbico similar.

[0142] Más arriba, la Propensión de Agregación Espacial se calculó como un promedio durante la ejecución de simulación de 30ns. Los resultados calculados usando la simulación se compararon luego con la propensión de agregación espacial de la estructura de rayos X, sin simulación molecular. La propensión de agregación espacial (rayos X) se calculó para R = 5 Å y para R = 10 Å. La propensión a la agregación espacial (rayos X) fue similar a la del valor promediado de la simulación, con picos en las mismas ubicaciones pero con diferencias en la magnitud de los picos. Las diferencias fueron mayores con el radio mayor del parche, R = 10Å. Esto es probablemente porque las diferencias son aditivas cuando se buscan tamaños de parche grandes. Estas diferencias surgen debido a la exposición cambiante de la superficie de los residuos en la ejecución de simulación dinámica. Sin embargo, esta comparación muestra que se puede obtener una buena estimación inicial de la propensión a la agregación espacial, especialmente para un radio bajo del parche R, a partir de la propia estructura de rayos X.

[0143] Los valores de propensión de agregación espacial de la simulación para R = 5 Å y 10 Å se mapearon en la estructura del anticuerpo. En ambos casos, la superficie del anticuerpo se coloreó de acuerdo con los valores de la propensión a la agregación espacial. En ambos radios utilizados en el cálculo de la propensión a la agregación espacial (5 Å y 10 Å) se observó que la superficie es predominantemente hidrófila. Esto es nuevamente como se esperaba ya que la mayor parte de la superficie de la proteína es usualmente hidrofílica. Sin embargo, algunas regiones hidrofóbicas eran notables. El contraste entre las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas es más prominente en los radios más altos del parche utilizado en el cálculo de SAP, R = 10Å. Algunas de las regiones hidrofóbicas identificadas tienen una excelente correlación con regiones del anticuerpo que se sabe que interactúan con otras proteínas. Un parche alrededor de los residuos 234 y 235 en la región bisagra es donde el receptor Fc interactúa. Un segundo parche alrededor del residuo 253 corresponde a la región en el fragmento Fc donde interactúan la proteína A y la proteína G. Se observó un parche hidrófobo significativo al final del fragmento Fab que corresponde a la región donde el anticuerpo se une a los antígenos. Gráficos de propensión de agregación espacial para R = 5 Å y 10 Å respectivamente, en los que se puede observar la misma correlación de picos con las regiones que interactúan. Los sitios de interacción proteica se obtuvieron a partir de la estructura de rayos X de complejos proteicos, entradas BDP 1T89, 1FC2 y 1FCC (Radaev, J. Biol. Chem. 2001, 276 (19) 16469; Deisenhofer et al. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1978. 359, 975 - 985; Deisenhofer, J. Biochemistry. 1981, 20, 2361 - 2370; Sauer - Eriksson et al., Structure, 1995, 3, 265). Las interacciones hidrofóbicas se correlacionan muy bien con los picos positivos de propensión a la agregación espacial y las interacciones hidrofílicas se correlacionan bien con los picos negativos de propensión a la agregación espacial. Por lo tanto, el parámetro de propensión de agregación espacial también se puede utilizar para predecir los sitios de unión de proteínas. En las pocas excepciones en las que los residuos con baja propensión a la agregación espacial (es decir, cerca de cero, ya sea positiva o negativa) también interactúan, se observó que las interacciones son en realidad con los átomos de la cadena principal principal, en lugar de con las cadenas laterales.

[0144] Además de los parches hidrófobos que ya se ha demostrado que interactúan con otras proteínas discutidas anteriormente, se identificaron parches hidrófobos adicionales en la superficie del anticuerpo (regiones 4 a 6). La región 5 en la parte inferior de Fc era significativamente hidrofóbica, pero está algo enterrada en su interior, con una región hidrofílica en sus bordes. De manera similar, las regiones 4 y 6 son hidrofóbicas y están expuestas al disolvente, pero están orientadas hacia el interior del anticuerpo. Las regiones 4 y 6 aún podrían estar potencialmente involucradas en interacciones con otras proteínas si están expuestas debido a cambios conformacionales significativos o al despliegue del anticuerpo. Todos los parches hidrofóbicos (regiones 1 a 6) también se pudieron observar en el radio de parche más pequeño (R = 5 Å), aunque con menos contraste en comparación con el radio de parche más alto (R = 10 Å).

[0145] Los valores de propensión a la agregación espacial (rayos X) que se basan solo en la estructura de rayos X también se mapearon en la superficie del anticuerpo, para compararlos con los valores promediados de la simulación. Comparando la agregación espacial: la propensión calculada mediante simulación o usando solo la estructura de rayos X mostró que las regiones hidrofóbicas identificadas eran bastante similares. Por supuesto,

5 existen algunas diferencias, como la intensidad de los parches de interacción de Proteína A. Sin embargo, esta comparación demuestra que la propensión a la agregación espacial (rayos) basada solo en la estructura de rayos X se puede utilizar para obtener una buena descripción de la distribución de parches hidrofóbicos en la superficie. Esto es importante ya que la simulación atomística de un anticuerpo completo es computacionalmente exigente. Para las proteínas que carecen de un modelo estructural de rayos X, el mismo parámetro de propensión a la agregación espacial se puede aplicar a la estructura generada a través del modelado de homología o la predicción de la estructura ab-initio. Se observó que la estructura de homología era muy similar a la estructura de rayos X, y sus valores de propensión a la agregación espacial también son similares a la estructura de rayos X.

10 **[0146]** Por lo tanto, la propensión a la agregación espacial identifica los parches hidrofóbicos en la superficie del anticuerpo. Estos parches podrían estar expuestos de forma nativa debido a las fluctuaciones dinámicas o al despliegue parcial del anticuerpo. Algunos de estos parches hidrofóbicos también se correlacionan bien con las regiones que interactúan con otras proteínas. Con el fin de probar si estos parches hidrofóbicos predichos por la propensión a la agregación espacial también están implicados en la agregación, se realizaron mutaciones en estas regiones específicas para cambiar los residuos hidrofóbicos en residuos hidrófilos. Los anticuerpos resultantes mostraron menos comportamiento de agregación y estabilidad mejorada. Además de identificar residuos propensos a la agregación, también se observó que el método SAP identifica correctamente las regiones del anticuerpo propensas a unirse con otras proteínas. Por lo tanto, el método podría aplicarse ampliamente a todas las proteínas para identificar las regiones propensas a la agregación o las regiones de unión con otras proteínas.

20 **Ejemplo 3: Selección de sitios de anticuerpos para ingeniería de estabilidad**

25 **[0147]** Los residuos identificados con altas propensiones de agregación espacial (y, por lo tanto, están en el centro de motivos propensos a la agregación identificados por los inventores) se exponen en la Tabla 1. Dado que estos están en el centro de los motivos, estos residuos así como aquellos residuos dentro de 5 Å (o 10 Å si se usa una ventana de 10 Å en el cálculo) se pueden modificar a residuos menos hidrofóbicos para reducir la agregación y/o aumentar la estabilidad. Los residuos se identificaron para un anticuerpo IgG1 humano (con cadena ligera kappa), y los residuos correspondientes en las diferentes clases de IgG se muestran en la Tabla 1.

30 Tabla 1: Los motivos propensos a la agregación en diversos dominios para todos los tipos de anticuerpos IgG. Las diferencias entre IgG están subrayadas. **Motivos propensos a la agregación**

Dominio	Número de residuo	Nombres de residuo			
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
C_{H1}	175	L	L	L	L
Bisagra	234	L	P	L	F
	235	L	V	L	L
C_{H2}	253	I	I	I	I
	282	V	V	V	V
	291	P	P	P	P
	296	Y	F	Y	F
	309	L	V	L	L
	328	L	L	L	L
	329	P	P	P	P
	330	A	A	A	S
C_{H3}	398	L	L	L	L
	443	L	L	L	L
C_L		Kappa		Lambda	
	110	V		K	
	154	L		P	
	201	L		---	

60 **[0148]** La Tabla 1 muestra que los motivos se conservan en su mayoría entre las diferentes IgG con algunas diferencias. Sin embargo, la mayoría de las diferencias son de un aminoácido hidrofóbico a otro aminoácido hidrofóbico. Por lo tanto, la hidrofobicidad del motivo permanece intacta incluso con estas diferencias y, por lo tanto, las otras clases con residuos hidrofóbicos en la misma posición también son motivos propensos a la agregación. Hay algunas excepciones a esto (A330S, V110K y la eliminación de L201) que no son motivos propensos a la agregación. Además de estas excepciones, los motivos identificados aquí tienen hidrofobicidad expuesta similar y

valores de SAP más altos para todas las clases de anticuerpos IgG.

[0149] La Tabla 2 muestra residuos hidrofóbicos organizados en motivos propensos a la agregación.

5 Tabla 2: Catorce motivos de la región constante de la molécula IgG1.

Dominio	SAP _{5Å} > 0,15	Residuos con (SAP _{5Å} > 0) dentro de 5Å de (SAP _{5Å} > 0,15) (Número de motivo susceptible de agregación)
C _{H1} (119 - 224)	175 LEU	174 VAL 1 175 LEU 1 181 TYR 1
Bisagra (221 - 237)	227 PRO 228 PRO 229 CYS 230 PRO 231 ALA 232 PRO 234 LEU 235 LEU	226 CYS 2 227 PRO 2 228 PRO 2 229 CYS 2 230 PRO 2 231 ALA 2 232 PRO 2 234 LEU 3 235 LEU 3
C _{H2} (238 - 345)	253 ILE 282 VAL 291 PRO 296 TYR 309 LEU 329 PRO 330 ALA	252 MET 4 253 ILE 4 282 VAL 5 291 PRO 6 296 TYR 7 308 VAL 8 309 LEU 8 328 LEU 9 329 PRO 9 330 ALA 9 331 PRO 9
C _{H3} (346 - 447)	395 PRO 398 LEU 443 LEU	395 PRO 10 396 PRO 10 397 VAL 10 398 LEU 10 404 PHE 10 443 LEU 11
C _L (110 - 214)	110 VAL 154 LEU 201 LEU	110 VAL 12 111 ALA 12 153 ALA 13 154 LEU 13 201 LEU 14

Ejemplo 4 - Selección de sitios de anticuerpos para ingeniería de estabilidad

[0150] Para demostrar que los motivos propensos a la agregación identificados por su SAP están implicados en la agregación y/o la inestabilidad, se generaron mutaciones en las regiones identificadas para cambiar los residuos hidrófobos en residuos hidrófilos. Aquí los residuos seleccionados fueron todos cambiados a lisina. En general, los aminoácidos que forman los motivos generales pueden reemplazarse por aminoácidos que son más hidrófilos en la escala de Black y Mold, en particular por Thr, Ser, Lys, Gln, Asn, His, Glu, Asp y Arg. Las regiones seleccionadas fueron las siguientes: A1 (L235K), A2 (I253K), A3 (L309K), A4 (L309K, L235K) y A5 (L234K, L235K). Los anticuerpos mutantes resultantes mostraron menos comportamiento de agregación y estabilidad mejorada como se describe en el Ejemplo 6.

Ejemplo 5 - Expresión y purificación de variantes de anticuerpos

[0151] Los restos seleccionados discutidos en el Ejemplo 4 anterior se mutaron y las variantes de anticuerpos resultantes se expresaron y purificaron. Los vectores que portan la cadena ligera o los genes de cadena pesada del Anticuerpo A de IgG1 humano se obtuvieron subclonando los genes de vectores patentados (Novartis) en un vector gWIZ (Genlantis), optimizado para alta expresión de la transfección transitoria. Las variantes de anticuerpos se generaron siguiendo el protocolo de Stratagene para la mutagénesis dirigida al sitio. Todos los constructos se confirmaron mediante secuenciación de ADN. El ADN plasmídico en la escala de mg se purificó a partir de cultivos bacterianos con columnas ADN Maxi Prep (Invitrogen). Se siguieron los protocolos del fabricante para el crecimiento y la transfección transitoria de células FreeStyle HEK 293 (Invitrogen). En resumen, para la transfección del cultivo

de 1L, se incubó 1 mg de ADN total (0,5 mg de los vectores HC y LC cada uno) con 20 ml de solución OptiPro durante 15 minutos; al mismo tiempo, se incubaron 2 mg del reactivo de transfección polietilenimina (PEI (Polysciences) a 1 mg/ml) con 20 ml de solución OptiPro durante 15 minutos. La solución de PEI luego se añadió a la solución de ADN, se mezcló mediante turbulencia y se incubó durante otros 15 minutos. Se añadieron alícuotas de 20 ml de mezcla de PEI/ADN a cultivos celulares de 500 ml a $1,0 \times 10^6$ células/ml. Las células transfectadas se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 7-9 días.

[0152] Se purificaron el tipo salvaje de anticuerpo y las variantes del sobrenadante del cultivo tisular en una columna de Proteína A (GE Healthcare) con el uso de un sistema purificador FPLC AKTA (GE Healthcare). Los anticuerpos se eluyeron de la columna con tampón de citrato 50 mM, pH 3,5, y se equilibraron a pH 6,6-7,0 con Tris-HCl 1M, pH 9,0. Este eluato se pasó por una columna de Q Sepharose (GE Healthcare) para eliminar las impurezas cargadas negativamente. A pH 7,0 e inferior, los anticuerpos están cargados positivamente y permanecen en el flujo continuo, mientras que las impurezas cargadas negativamente se unen a la matriz cargada positivamente de la columna Q Sepharose. La solución con anticuerpo purificado se concentró con filtros MWCO de 30 K (Millipore, VWR) y se cambió el tampón con tampón His 20 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de 150 mg/ml.

[0153] Como un control de calidad, se analizaron alícuotas de las muestras purificadas y concentradas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. Se incubaron alícuotas de proteína de 4 mg por muestra en tampón desnaturante sin o con DTT y se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% (Pierce). La variante A1 se comparó con el tipo silvestre también mediante dicroísmo circular en el que los espectros fueron esencialmente idénticos, lo que muestra que las dos proteínas tenían esencialmente el mismo grado de estructura secundaria.

Ejemplo 6 - Caracterización Biofísica de Variantes de Anticuerpo

[0154] La estabilidad de las variantes de anticuerpo se analizó con tres métodos analíticos diferentes.

Ensayo de turbidez

[0155] Se llevó a cabo un ensayo de turbidez a 65°C durante hasta 4 horas. El anticuerpo A y las variantes estaban a una concentración de 150 mg/ml en His 20 mM, pH 6,5, y se diluyeron 15 veces en tampón de fosfato de potasio 15 mM, pH 6,5 a 10 mg/ml para la evaluación de la turbidez. Además de las observaciones cualitativas, la turbidez se cuantificó después de diluir aún más las muestras a 1 mg/ml y registrar los valores de absorbancia a 320 nm como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Comparación del ensayo de turbidez del tipo salvaje del Anticuerpo A y variantes. Las muestras a 150 mg/ml se incubaron a 65°C durante hasta 4 horas. Los asteriscos indican el estado de la solución a 10 mg/ml, o si la muestra se ha gelificado, de la siguiente manera: * indica un líquido, turbio tras la dilución; ** indica gel, transparente tras la dilución; y *** denota un gel, turbio a la dilución. Los valores sin asteriscos eran líquidos, claros tras la dilución. Los números representan la absorbancia a 320 nm después de una dilución adicional de las muestras a 1 mg/ml.

Variante	0 H	1 H	2 H	4H
WT	0,02	0,06	0,27*	***
A1	0,01	0,03	0,04	0,19*
A2	0,01	0,04	0,07	**
A3	0,01	0,03	0,05	**
A4	0,01	0,04	0,04	0,13*
A5	0,01	0,04	0,09	0,14*

Exclusión de tamaño - Cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC)

[0156] Como un segundo ensayo preferido, se usó SEC-HPLC para determinar la pérdida de monómero a lo largo del tiempo en experimentos de agregación acelerada. El anticuerpo de tipo silvestre y las variantes se incubaron en un termociclador (BioRad) a 150 mg/ml a 58°C durante hasta 24 horas. Para cada punto de tiempo, alícuotas de muestra de 2 ml se diluyeron 15 veces en tampón de fosfato de potasio 15 mM, pH 6,5 hasta una concentración final de 10 mg/ml. Los monómeros se resolvieron a partir de especies no monoméricas mediante SEC-HPLC en una columna TSKgel Super SW3000 (TOSOH Bioscience), mantenida a 22°C, con una fase móvil de fosfato de potasio 150 mM, pH 6,5, a un caudal de 0,2 ml/min. El porcentaje de monómero se calculó como el área del pico monomérico dividido por el área total de todos los picos detectados a 280 nm.

Microcalorimetría de barrido diferencial

[0157] En tercer lugar, se comparó la estabilidad termodinámica de las variantes y el tipo salvaje del anticuerpo A mediante la microcalometría de barrido diferencial (DSC, Microcal). Los MAb tienen termogramas de DSC característicos con tres transiciones de fusión, si no solapantes: Fab, C_{H2} y C_{H3} (Ionescu y col., J Pharm Sci, v. 97, 1414, 2008; Mimura y col., J Biol Chem, v. 276, 45539, 2001). En las condiciones experimentales utilizadas aquí, el anticuerpo A Fab tiene una transición de fusión a 77°C. Las temperaturas de fusión de C_{H2} y C_{H3} están a 73°C y 83°C, respectivamente. Por lo tanto, en el anticuerpo A, C_{H2} es el dominio de anticuerpo con la temperatura de fusión más baja.

[0158] Se analizaron el anticuerpo de tipo silvestre A y las variantes A1-A5 a una concentración de 2 mg/ml en 20 mM de tampón His pH 6,5 y una velocidad de calentamiento de 1,0 grado por minuto. Los datos de la muestra se analizaron mediante la sustracción de los datos de referencia, la normalización de la concentración de proteína y el volumen de células DSC, y la interpolación de una línea base cúbica. Los picos se deconvolucionan mediante un ajuste no de 2 estados usando el software Microcal Origin 5,0. Una comparación de los termogramas mostró un aumento de la transición de fusión de C_{H2} en las variantes en comparación con el tipo salvaje en 1 a 3 grados, con la diferencia más pronunciada para las variantes dobles A4 y A5 (tabla 4 a continuación).

Tabla 4: T_{m1} es la transición de fusión para el dominio C_{H2}. T_{m2} es la transición de fusión para el dominio Fab. T_{m3} es la transición de fusión para el dominio C_{H3}.

MAb	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
WT	73,5	77,3	83,6
A1	76,0	77,8	83,5
A2	75,0	77,5	83,4
A3	75,5	77,6	83,4
A4	76,2	77,7	83,1
A5	76,3	77,9	83,3

Ejemplo 7 - Resumen

[0159] Los resultados de los experimentos de turbidez, SEC-HPLC y DSC del anticuerpo tipo A y variantes se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de resultados para el tipo A del anticuerpo salvaje y variantes. Leyenda: + menos estable; + + estable como WT; + + + más estable; + + + + más estable.

Variante	Mutación	Dominio	Estabilidad relativa basada en		
			Turbidez	HPLC	DSC
WT	na	na	++	++	++
A1	L235K	C _{H2} lower hinge	++++	+++	+++
A2	I253K	C _{H2} -C _{H3} junta	+++	+++	+++
A3	L309K	C _{H2}	+++	+++	+++
A4	L235K L309K	C _{H2}	++++	++++	++++
A5	L234K L235K	C _{H2}	++++	+++	++++

[0160] Cada uno de los tres mutantes únicos A1, A2 y A3 mostró una estabilidad mejorada por cada uno de los tres métodos analíticos. En el ensayo de turbidez, la dilución de la muestra de anticuerpo A de tipo silvestre estresada a 65°C durante 2 horas dio como resultado una turbidez de la solución, mientras que las soluciones para todas las variantes permanecieron claras. Los resultados de SEC-HPLC de muestras sometidas a estrés a 58°C durante 24 horas indicaron un aumento de monómero del 91% para el tipo silvestre al 93-95% para las variantes. Al ser la población inicial de monómeros del 99%, las especies no monoméricas en las variantes disminuyeron hasta la mitad en comparación con el tipo salvaje. El análisis DSC mostró un aumento de la transición de fusión para C_{H2} (el dominio con la transición de fusión más baja en el anticuerpo A) de 73°C para el tipo silvestre a 75-76°C para las variantes.

[0161] La sustitución de residuos de SAP alto en la variante A1 mejoró aún más la estabilidad, como lo demuestran los resultados de turbidez y los termogramas de DSC para las variantes A4 y A5. Los resultados de SEC-HPLC mostraron una mejora con respecto a la Variante A1 solo para la Variante A4 (96% de monómero después de 24 horas de estrés) y no para la Variante A5 (93% de monómero después de 24 horas de estrés, como Variante A1).

[0162] A modo de confirmación, se generaron mutaciones similares en un segundo anticuerpo con la adición de la mutación de residuos en las regiones CDR del anticuerpo. Todas menos una de las mutaciones probadas mejoraron la estabilidad y/o la agregación reducida. Las mutaciones en un residuo en una región CDR no funcionaron como se

predijo, sin embargo, esto pudo deberse a que esta variante no expresó bien, que pudo haberse debido a un defecto en el plegamiento y, por lo tanto, tenía un mayor grado de agregación que el tipo salvaje incluso antes del análisis de agregación acelerada. Por lo tanto, todas las mutaciones probadas en regiones marco y conservadas produjeron el resultado previsto, lo que demuestra que el algoritmo SAP es robusto con la única posible excepción de las mutaciones que no pueden plegarse adecuadamente. Sin embargo, dado que todas las mutaciones están relacionadas con residuos expuestos a la superficie e implican la sustitución con más residuos hidrófilos, se espera que tales problemas de plegamiento sean poco frecuentes.

Ejemplo 8 - Análisis de estabilidad de variantes adicionales de anticuerpos

[0163] Se diseñaron y analizaron variantes adicionales para una estabilidad mejorada en el primer y segundo anticuerpo. Los sitios para la mutación se basaron en las predicciones de SAP. Las mutaciones en cada variante se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6: Posición de los sitios mutados en variantes adicionales.

Variante	Anticuerpo de inicio	Base	Mutación	Dominio
A6	Ab-1	SAP	L235S	Bisagra
A7	Ab-1	SAP	V282K	C _H 2
A8	Ab-1 Var A4	SAP	V282K L235K L309K	Bisagra C _H 2
B6	Ab-2	SAP	L235E	C _H 2

[0164] Se usó SEC-HPLC para determinar la pérdida de monómero a lo largo del tiempo en experimentos de agregación acelerada. Para el primer anticuerpo, se incubaron anticuerpos de tipo salvaje y variante en un termociclador (BioRad) a 150 mg/ml a 58°C durante hasta 24 horas. Para el segundo anticuerpo, se incubaron anticuerpos de tipo silvestre y variante en un termociclador (BioRad) a 60 mg/ml a 52°C durante hasta 36 horas. Para cada punto de tiempo, alícuotas de muestra de 2 ml se diluyeron 15 veces en tampón de fosfato de potasio 15 mM, pH 6,5 hasta una concentración final de 10 mg/ml. Los monómeros se resolvieron a partir de especies no monoméricas mediante SEC-HPLC en una columna TSKgel Super SW3000 (TOSOH Bioscience), mantenida a 22°C, con una fase móvil de fosfato de potasio 150 mM, pH 6,5, a un caudal de 0,2 ml/min. El porcentaje de monómero se calculó como el área del pico monomérico dividido por el área total de todos los picos detectados a 280 nm.

[0165] La variante A6 mostró un aumento de 95,5% para el tipo salvaje a 96% de monómero a las 12 horas y un aumento de 91% para el tipo silvestre a 92% de monómero a las 24 horas. La variante A7 mostró un aumento de 96,5% para el tipo silvestre a 97,5% de monómero a las 12 horas y un aumento de 91% para el tipo natural a 94% de monómero a las 24 horas. La variante A8 mostró un aumento de 96,5% para el tipo silvestre a 98,5% de monómero a las 12 horas y un aumento de 91% para el tipo natural a 97% de monómero a las 24 horas. La variante B6 no mostró diferencia significativa en el monómero en porcentaje a las 12 horas, mostró un aumento de 97,5% para el tipo silvestre a 98% de monómero a las 24 horas, y un aumento de 96% para el tipo silvestre a 97% de monómero a las 36 horas.

Ejemplo 9 - El papel de las interacciones proteína-carbohidratos en SAP y estabilidad

[0166] En este ejemplo, se determinó el efecto de la glicosilación de un anticuerpo sobre los valores de SAP. El SAP se determinó a $R = 5 \text{ \AA}$ para el anticuerpo completo tanto con como sin glicosilación. El SAP para el anticuerpo con glicosilación se determinó a partir de 30ns de simulación de dinámica molecular del anticuerpo completo con GO-glicosilación. El SAP para el anticuerpo sin glicosilación se determinó con la misma simulación, pero en donde se eliminó la glicosilación durante el análisis de SAP. Las regiones de SAP alto son las regiones más propensas a la agregación. Se observó que la eliminación de la glicosilación aumentaba significativamente el SAP en las regiones cubiertas por la glicosilación, especialmente para los residuos F241 y F243. Por lo tanto, la eliminación o desplazamiento de la glicosilación condujo a un aumento significativo en las regiones propensas a la agregación. Estas regiones podrían causar directamente la agregación o disminuir la barrera de energía libre para desplegarse, haciendo que la forma no glicosilada sea menos estable en comparación con la forma glicosilada.

[0167] Para explorar adicionalmente el papel de las interacciones proteína-carbohidrato experimentalmente, se generaron dos mutantes de anticuerpo, F241 S F243S (variante FS) y F241Y F243Y (variante FY). La variante FS tiene residuos de fenilalanina que se sabe que interactúan con el resto de hidrato de carbono sustituido con residuos de serina polar que tienen cadenas laterales más pequeñas y no aromáticas (Deisenhofer, Biochem, 1981, 20, 2361-70; Krapp y col., J Mol Biol, 2003, 325, 979-89). En la variante FY, los mismos residuos de fenilalanina se sustituyen por residuos de Tyr, que se ha sugerido que tienen una mayor propensión a la interfase con el azúcar (Taroni et al., Protein Eng, 2000, 13, 89-98). Al mismo tiempo, otros restos hidrófobos, por ejemplo Val264, permanecen sin modificar en esta región. Tanto el tipo silvestre como la variante FY tuvieron muy poca, si es que se produjo, sialilación de sus carbohidratos, mientras que casi el 50% de las moléculas de la variante FS tenían al menos un residuo de ácido siálico.

[0168] Se comparó la estabilidad de tipo salvaje y las variantes FS y FY en experimentos de agregación acelerada y mediante microcalometría de barrido diferencial (DSC). Las muestras a 150 mg/ml se indujeron a agregarse a 58°C durante hasta 36 horas, y los niveles de monómero se resolvieron y se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Los niveles de monómero de tipo salvaje disminuyeron gradualmente de 100 a 96, 91 y 87% para puntos de tiempo de 0, 12, 24 y 36 horas. En comparación, la variante FY tuvo niveles de monómero reducidos en un 1-3% en los puntos temporales anteriores, pero se mantuvo en el 88% a las 36 horas, dentro del error estadístico de tipo salvaje. La variante FS fue significativamente menos estable a esta temperatura, mostrando una disminución del monómero del 99% al 39% a las 12 horas, y al 20% a las 24 horas. Las muestras de 36 horas no se realizaron con SEC-HPLC debido a la presencia de abundantes agregados visibles.

[0169] Los resultados de DSC también se diferencian entre las variantes y el tipo salvaje. La temperatura de fusión (T_m) del dominio C_{H2} disminuyó de 73°C para el tipo silvestre a 59°C para la variante FS. También se observaron diferencias menores en la variante FS, no superior a 1°C, para las transiciones de fusión de Fab y C_{H3} . Aunque el hombro de transición de fusión de C_{H2} de la variante FY se superpuso al de tipo salvaje, el ajuste del software indicó una disminución de C_{H2} T_m a 71°C, mientras que las otras dos T_m permanecen sin cambios.

[0170] Se llevaron a cabo varios experimentos adicionales para comparar la variante FS con el tipo silvestre y para comprender mejor la disminución observada en la estabilidad. La variante FS retuvo la misma estructura rica en hoja β que el tipo salvaje. La variante tenía diferentes patrones de movilidad en comparación con el tipo salvaje en la reducción, así como la electroforesis en gel nativa. Los experimentos de tratamiento con proteasas también se llevaron a cabo para comparar la exposición de la superficie de las proteínas en variante FS y tipo salvaje. La digestión de los anticuerpos con Glu-C fue más eficiente (más fragmentos pequeños) para la variante FS que para el tipo silvestre; esa eficacia se equalizó en gran medida en las contrapartes deglicosiladas variantes y de tipo salvaje, aunque persistieron algunas diferencias. Además, la variante FS retuvo la función de unión de FcRn y Fc γ RIa completa, pero perdió la unión a los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0171]

<110> Novartis AG
 Instituto Tecnológico de Massachusetts
 VOYNOV, VLADIMIR
 CHENNAMSETTY, NARESH
 KAYSER, VEYSEL
 HELK, BERNHARD
 TRUCHA, BERNHARDT L.

<120> INMUNOGLOBULINAS CON AGREGACIÓN REDUCIDA

<130> 61967-2000140

<140> Aún no asignado

<141> concurrentemente con esto

<150> US 61/074.466

<151> 2008-06-20

<150> US 61/151.368

<151> 2009-02-10

<160> 19

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 669 591 T3

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

20 <210> 2
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 30 Ser Thr Ser Glu Ser 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 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 40 Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
 85 90 95
 Glu Arg Lys Cys Cys
 100

45 <210> 3
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 55 Ser Thr Ser Glu Ser 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
 60 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 85 90 95
 65 Glu Ser Lys Tyr Gly
 100

ES 2 669 591 T3

<210> 4
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 4

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

25
 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 5

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

40
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 6

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

55
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

65
 <210> 8
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 669 591 T3

<400> 8

5 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>

106

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 9

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 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 Tyr Val Val
 50 55 60
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 25 65 70 75 80
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 85 90 95
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 100 105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 10

40 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
 45 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 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
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

60 <213> Homo sapiens

<400> 11

65

ES 2 669 591 T3

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

20 <210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 12

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

45 <210> 13
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 13

55

60

65

ES 2 669 591 T3

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

20 <210> 14
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 14

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

45 <210> 15
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 15

55

60

65

ES 2 669 591 T3

5 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln 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

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 Lys Arg Leu Thr
 50 55 60
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 65 70 75 80

15 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 85 90 95
 Ser Leu Gly Lys
 100

20
 <210> 16
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25
 <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

35 Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 35 40 45
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr
 50 55 60
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val
 65 70 75 80

40 Met His Glu Ala Leu His Asn His Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 85 90 95
 Ser Pro Gly Lys
 100

45
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

50
 <400> 17

55 Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr
 1 5

60
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

65 Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
 1 5
 <210> 19

ES 2 669 591 T3

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

5 <400> 19

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu

10

1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una formulación de inmunoglobulina modificada que comprende una inmunoglobulina modificada que tiene una propensión reducida a la agregación que comprende una mutación reductora de la agregación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en residuos de un motivo de agregación 1: 174 (C_{H1}), 175 (C_{H1}) y 181 (C_{H1}); un motivo de agregación 2: 226 (bisagra), 227 (bisagra), 228 (bisagra), 229 (bisagra), 230 (bisagra), 231 (bisagra) y 232 (bisagra); un motivo de agregación 4: 252 (C_{H2}) y 253 (C_{H2}); un motivo de agregación 5: 282 (C_{H2}); un motivo de agregación 6: 291 (C_{H2}); un motivo de agregación 7: 296 (C_{H2}); un motivo de agregación 8: 308 (C_{H2}) y 309 (C_{H2}); un motivo de agregación 9: 328 (C_{H2}), 329 (C_{H2}), 330 (C_{H2}) y 331 (C_{H2}); un motivo de agregación 10: 395 (C_{H3}), 396 (C_{H3}), 397 (C_{H3}), 398 (C_{H3}) y 404 (C_{H3}); un motivo de agregación 11: 443 (C_{H3}),
10 en donde la mutación reductora de la agregación es una sustitución con un residuo de aminoácido que es menos hidrófobo que el resto en la inmunoglobulina no modificada y la propensión a la agregación que se reduce es la agregación entre moléculas de inmunoglobulina en una solución líquida concentrada, donde la inmunoglobulina no modificada abarca las secuencias de dominio constante de: (a) SEQ ID NOs: 1, 5, 9 y 13, (b) SEQ ID NOs: 2, 6, 10 y 14, (c) SEQ ID NOs: 3, 7, 11 y 15, o (d) SEQ ID NOs: 4, 8, 12 y 16,
15 en donde la inmunoglobulina comprende además una afinidad de unión por un antígeno diana y la afinidad de unión por el antígeno diana es al menos el setenta por ciento, al menos el ochenta por ciento, al menos el noventa por ciento o al menos el cien por ciento de la afinidad de unión de la inmunoglobulina no mutada para el antígeno diana, y en donde la inmunoglobulina está en una concentración de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml.
- 25 **2.** La formulación de inmunoglobulina modificada de la reivindicación 1, en la que el resto de la mutación reductora de la agregación se selecciona (i) del grupo que consiste en residuos de un motivo de agregación 1: 175 (C_{H1}); un motivo de agregación 2: 227 (bisagra), 228 (bisagra) y 230 (bisagra); un motivo de agregación 3: 234 (bisagra) y 235 (bisagra); un motivo de agregación 4: 253 (C_{H2}); un motivo de agregación 5: 282 (C_{H2}); un motivo de agregación 6: 291 (C_{H2}); un motivo de agregación 7: 296 (C_{H2}); un motivo de agregación 8: 309 (C_{H2}); un motivo de agregación 9: 329 (C_{H2}) y 330 (C_{H2}); un motivo de agregación 10: 395 (C_{H3}) y 398 (C_{H3}); un motivo de agregación 11: 443 (C_{H3}).
- 30 **3.** La formulación de inmunoglobulina modificada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que 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 de la inmunoglobulina modificada es un monómero no agregado.
- 35 **4.** La formulación de inmunoglobulina modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 **5.** La formulación de inmunoglobulina modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la formulación de inmunoglobulina muestra al menos cinco por ciento, al menos diez por ciento, al menos quince por ciento, al menos veinte por ciento, al menos veinticinco por ciento, al menos treinta por ciento, al menos treinta y cinco por ciento, al menos cuarenta por ciento, o al menos cincuenta por ciento menos agregado después de veinticuatro horas de agregación acelerada en comparación con la inmunoglobulina no mutada bajo las mismas condiciones.
- 45 **6.** La formulación de inmunoglobulina modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la que la formulación de inmunoglobulina está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas y, opcionalmente, sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.
- 50 **7.** Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica la inmunoglobulina según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 8.** Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7, que comprende opcionalmente un promotor inducible unido operativamente al polinucleótido.
- 55 **9.** Un método para producir una inmunoglobulina con una propensión a la agregación reducida que comprende:
a) proporcionar un medio de cultivo que comprende la célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 8; y
b) colocar el medio de cultivo en condiciones bajo las cuales se expresa la inmunoglobulina; y
c) opcionalmente, aislar la inmunoglobulina.
- 60 **10.** Uso de la inmunoglobulina modificada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento que comprende una formulación líquida altamente concentrada donde la concentración de inmunoglobulina modificada es de al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml, o al menos 150 mg/ml, que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65 **11.** El uso de la reclamación 10 en el medicamento es un tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades

inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas y enfermedades oncológicas y neoplásicas, incluido el cáncer.

5 **12.** El uso de cualquiera de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el medicamento está sustancialmente libre de cualquier aditivo que reduzca la agregación de inmunoglobulinas y, opcionalmente, sustancialmente libre de histidina, sacáridos y polioles libres.

10 **13.** El uso de la inmunoglobulina modificada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 como ingrediente activo farmacéutico no agregante.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65