



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016009862-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 26/11/2014**

**(45) Data de Concessão: 21/12/2021**

---

**(54) Título:** MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO

**(51) Int.Cl.:** G01N 33/68; G06F 19/10.

**(30) Prioridade Unionista:** 29/11/2013 US 61/910,200.

**(73) Titular(es):** GENENTECH, INC..

**(72) Inventor(es):** VIKAS K. SHARMA; TREVOR E. SWARTZ; THOMAS W. PATAPOFF.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2014067580 de 26/11/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/081176 de 04/06/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 02/05/2016

**(57) Resumo:** MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO. São descritos aparelhos, sistemas, meios legíveis por computador, artigos de fabricação e métodos para selecionar um anticorpo. Aparelhos, sistemas, meios legíveis por computador, artigos de fabricação e métodos para a produção de um anticorpo selecionado. A seleção pode incluir a determinação de uma ou mais características físico-químicas do anticorpo. A determinação pode ser baseada em parâmetros estruturais do anticorpo.

**“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO”****REFERÊNCIA CRUZADA PARA OS PEDIDOS RELACIONADOS**

[0001] O presente pedido refere-se e reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório Norte Americano US 61/910.200, depositado em 29 de novembro de 2013, cujo relatório descritivo é incorporado ao presente em sua totalidade.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0002] Aspectos da presente divulgação dizem respeito a aparelhos, sistemas, meios legíveis por computador (suporte eletrônico), artigos de manufatura e métodos para a seleção de um anticorpo com uma ou mais propriedades desejáveis, especialmente propriedades desejáveis para um agente terapêutico, e para a fabricação do anticorpo ou agente terapêutico que compreende o anticorpo.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0003] Os anticorpos monoclonais (“Ab monoclonal” ou “mAb”) continuam a emergir como uma importante classe de agentes terapêuticos para o tratamento de uma variedade de doenças, incluindo cânceres, doenças autoimunes e infecções. Para a facilidade de utilização, conveniência do paciente e dosagens menos frequentes, é preferido que fosse desenvolvida uma forma farmacêutica aquosa que é estável durante a sua validade (tipicamente dois anos) e que o próprio mAb terapêutico tenha depuração e meia-vida plasmática normais (tipicamente 3 semanas).

[0004] Para a terapia baseada em mAb, destinada ao tratamento de determinadas doenças crônicas, por exemplo, artrite reumatoide, a entrega por via subcutânea utilizando um dispositivo tal como uma seringa/autoinjeter pré-carregado, pode ser utilizada a autoadministração ou administração em casa e adesão ao tratamento (vide, por exemplo, Eisenstein, M. *Something new under the skin. Nat Biotech* 29, 107-109 (2011)). Alguns produtos de mAb

estão comercialmente disponíveis em um dispositivo para utilização em casa, por exemplo, Humira® da Abbott, e Simponi® da Centocor, etc., e atualmente diversos outros estão sendo avaliados em testes clínicos. A fim de proporcionar várias centenas de miligramas da droga ativa em um pequeno volume (~ 1 mL), utilizando um dispositivo, é necessária uma formulação líquida contendo altas concentrações de mAb (vide, por exemplo, Eisenstein, M. *Something new under the skin. Nat Biotech* 29, 107-109 (2011); Shire, S.J., Shahrokh, Z. & Liu, J. *Challenges in the development of high protein concentration formulations. Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 1390-1402 (2004). Tais sistemas de entrega exigem que a solução seja de baixa viscosidade, pois soluções com viscosidade mais elevada são difíceis de produzir e administrar, e poderiam ser dolorosas ao injetar devido à necessidade de uma agulha de maior calibre e forças envolvidas (vide, por exemplo, Shire, S.J., Shahrokh, Z. & Liu, J. *Challenges in the development of high protein concentration formulations. Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 1390-1402 (2004)). Além disso, é necessário que o anticorpo permaneça estável (degradação química ou física mínima) em solução sem a perda de eficácia mantendo a segurança até atingir um período de validade (vida útil) suficiente. Além disso, a fim de evitar injeções múltiplas por dose ou dosagens mais frequentes com a necessidade de administração por via subcutânea em baixo volume, é vantajoso desenvolver um mAb candidato com biodisponibilidade suficiente, e que também exibe um perfil de depuração normal associado a um longo período de meia-vida (vide, por exemplo, Wang, W., Wang, E.Q. & Balthasar, J.P. *Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther* 84, 548-558 (2008); Zheng, Y. *et al. Minipig as a potential translatable model for monoclonal antibody pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration. mAbs* 4, 243-255; vide também Chennamsetty, N., Voynov, V., Kayser, V., Helk, B. & Trout, B.L. *Design of*

*therapeutic proteins with enhanced stability. Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11937-11942 (2009)). Assim, existe a necessidade de um método ou aparelho que facilite a predição de anticorpo (Ab) com propriedades desejáveis.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[0005] São fornecidos aspectos e exemplos de realização que dizem respeito a novos aparelhos e métodos para auxiliar na seleção e manufatura de anticorpos. A viscosidade das soluções mAb em concentrações definidas, taxa de depuração *in vivo*, tal como em macacos *Cynomolgus* (*Cyno*), oxidação de triptofano (Trp) e isomerização de ácido aspártico (Asp), foram estudados como propriedades de mAb exemplares importantes para a fabricação ótima, desenvolvimento, injetabilidade, validade (vida útil) e o comportamento farmacocinético, e permitindo assim a entrega da droga, eficácia e facilidade de uso pelo paciente. Foi demonstrado que utilizando os parâmetros estruturais identificados pela presente invenção e através de simulações de dinâmica molecular (MD), pode-se prever de forma razoavelmente bem os atributos desejáveis de mAbs e a classificação de risco (*risk-rank*) de mAb candidatos para a seleção final.

[0006] Tal como descrito na presente invenção, as propriedades extraídas a partir da sequência de aminoácidos do mAb (“propriedades extraídas da sequência”, “propriedades baseadas na sequência”, “parâmetros estruturais” ou “parâmetros estruturais baseados na sequência”) tais como carga, assimetria de carga, e hidrofobicidade, juntamente com ferramentas de análise multivariada, são suficientes para diferenciar entre mAbs de diferentes perfis de viscosidade-concentração, entre os mAbs com valores de depuração normal e rápido e entre os mAbs com estabilidade desejável e indesejável, tais como em relação à oxidação de Trp e isomerização de Asp. Enquanto as interações intermoleculares e intramoleculares contribuem com a viscosidade, a

depuração e estabilidade envolvem a estrutura tridimensional e as dinâmicas associadas, este é um resultado inesperado do presente trabalho em que os parâmetros estruturais baseados nas sequências descritos na presente invenção podem determinar ou predizer de maneira suficiente as propriedades do anticorpo (Ab), tais como a viscosidade, taxa de depuração e estabilidade. Além disso, é um resultado inesperado do presente trabalho que os parâmetros estruturais baseados na sequência possam predizer ou diferenciar de forma suficiente as propriedades de Ab entre diversos Abs, especialmente Abs dentro da mesma classe.

[0007] Para propriedades sítio-específicas, como oxidação de Trp ou isomerização de Asp, as dinâmicas locais e os atributos conformacionais parecem desempenhar um papel importante; por esse motivo uma análise de MD com base na estrutura pode ser necessária. A inclusão de modelagem estrutural por MD com ferramentas computacionais *in silico* pode permitir a triagem de um número maior de candidatos com o mínimo de tempo e recursos gastos em comparação com outras abordagens experimentais molhadas, e, portanto, aumenta a eficiência na seleção de anticorpos candidatos. Foi demonstrado na presente invenção que, por meio de análise cuidadosa de movimentos moleculares utilizando simulações de DM e pela extração das propriedades estruturais relevantes, pode-se diferenciar entre sítios reativos e não reativos relevantes para a validade de um agente terapêutico contendo Ab. Dependendo do mecanismo de reação, pode ser necessária a avaliação de diferentes conjuntos de parâmetros. Por exemplo, para a oxidação do Trp, a média temporal da área de superfície acessível ao solvente (SASA) de um resíduo Trp (cadeia lateral) foi suficiente para diferenciar entre os sítios reativos e não reativos; entretanto, os parâmetros estruturais adicionais, juntamente com análise multivariada, foram necessários para diferenciar entre os sítios de isomerização Asp. A presente invenção mostra que é possível realizar a

análise estrutural baseada na sequência *in silico* nos mAbs para selecionar candidatos com atributos de desenvolvimento desejáveis. Esta capacidade pode aumentar a probabilidade de sucesso técnico para mover novas terapias baseadas em mAb de modo eficiente ao desenvolvimento clínico e, finalmente, beneficiar os pacientes.

[0008] Em aspectos adicionais, a invenção também fornece anticorpos selecionados, produzidos e/ou anticorpos determinados a satisfazer um determinado critério de design, através dos métodos descritos na presente invenção.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0009] As Figs. 1A e B são Tabelas de Parâmetros para Análise de Regressão de Componentes Principais para predição da viscosidade a partir de resultados de 10 mAbs em alta força iônica (IS) (Fig. 1A) e 10 mAbs com sobreposição parcial em baixa IS (Fig. 1B).

[0010] A Fig. 2 é uma tabela de valores de depuração em macacos *Cyno* e os parâmetros estruturais baseados na sequência calculados para um conjunto de treinamento de 13 mAbs. As colunas tracejadas da tabela HI Soma, Fv carga pH 5,5 e Depuração correspondem aos intervalos das colunas Valor da soma HI, carga r Depuração da tabela da Fig. 3. As colunas com tracejado em barra inclinada para direita da tabela na Fig. 2 indica que o valor da entrada encontra-se dentro de um intervalo indicado nos valores da linha superior na figura 3. As colunas com tracejado em barra inclinada para esquerda da tabela na Fig. 2 indica que o valor da entrada encontra-se dentro de um intervalo indicado nos valores da linha inferior na figura 3.

[0011] A Fig. 3 é uma Tabela de critérios atribuídos com base no conjunto de treino de 13 mAbs conforme mostrado na Fig. 2 para diferenciar entre a depuração rápida e a depuração normal em macacos *Cyno*.

[0012] A Fig. 4 é uma tabela de Atribuição de Depuração

Experimental *versus* Prevista em um conjunto de 45 mAbs com base nos critérios enumerados na Fig. 3, com a coluna CI da Tabela 4 correspondendo à coluna Depuração da Fig. 2 e estendida às colunas Atribuição experimental e prevista da Fig. 4.

[0013] A Fig. 5 é uma tabela Predição de *hot spots* da Oxidação do Trp utilizando SASA da cadeia lateral para Trps de vários resíduos (Resnum) ao longo de uma cadeia pesada (HC) ou cadeia leve (LC) no conjunto de treinamento de 13 mAbs. (Veja a descrição detalhada, abaixo, para as outras colunas da tabela.) Colunas com tracejado em barra inclinada para direita na tabela indicam que o valor da entrada encontra-se dentro de um intervalo desejado. Colunas com tracejado em barra inclinada para esquerda na tabela indicam que o valor da entrada encontra-se fora de um intervalo desejado.

[0014] A Fig. 6 é uma tabela de propriedades moleculares extraídas a partir de simulações MD de resíduos Asp em vários locais “n” ao longo da HC e LC (dados na coluna Asp da Tabela) de alguns dos mAbs do conjunto de treino, e o resíduo em n+1 (dado na coluna Resíduo Seq (N + 1) Tabela). As propriedades incluem SASA do Asp (SASA\_Asp), raiz quadrada média da oscilação  $\alpha$ -carbono Asp (RMSF), SASA do resíduo em n+1 (SASA (N+1,N)), e valores mensurados e preditos arredondados para um algarismo significativo (binário). (Veja a descrição detalhada, abaixo, para as outras colunas da tabela.) Colunas com tracejado em barra inclinada para direita na tabela indicam que o valor da entrada encontra-se dentro de um intervalo desejado. Colunas com tracejado em barra inclinada para esquerda na tabela indicam que o valor da entrada encontra-se fora de um intervalo desejado.

[0015] A Fig. 7 mostra os perfis de viscosidade-concentração de vários mAbs em uma solução tamponada de elevada força iônica (200 mM de arginina-HCl) em pH 5,5. Cada conjunto de pontos de dados representa os

dados experimentais correspondentes para um mAb específico. As Linhas foram geradas usando uma equação da forma  $y=a+be^{cx}$ , em que o eixo y é a viscosidade (em centipoise, cP) e o eixo x é a concentração de proteína (em mg/mL).

[0016] As Figs. 8A-8C exibem a análise de parâmetros baseados na sequência de diversos mAbs calculados conforme descrito na seção Exemplos, abaixo: Fig. 8A apresenta a carga Fv em pH 5,5; Fig. 8B apresenta o Parâmetro de Simetria da carga Fv (FvCAP) em pH 5,5; Fig. 8C apresenta a hidrofobicidade (ou índice de hidrofobicidade, HI). Carga foi calculada utilizando a sequência do fragmento variável (Fv) inteiro para Fig. 8A e utilizando a sequência do domínio variável de cadeia pesada (VH) e a sequência do domínio variável de cadeia leve (VL) para o cálculo do FvCAP para a Fig. 8B. O HI foi calculado utilizando a composição de aminoácidos de regiões determinantes de complementaridade (CDR) para Fig. 8C.

[0017] As Figs. 9A-9C mostram gráficos de correlação do log da viscosidade com parâmetros estruturais baseados na sequência calculados: Na Fig. 9A o parâmetro é a hidrofobicidade; na Fig. 9B, a carga Fv a pH 5,5; e na Fig. 9C, FvCAP a pH 5,5. Os valores de viscosidade foram obtidos em soluções tamponadas de baixa força iônica na concentração de tampão de 20 mM a pH 5,5.

[0018] As Figs. 10A-10C mostram gráficos de correlação do log da viscosidade com parâmetros estruturais baseados na sequência calculados: Na Fig. 10A o parâmetro é a hidrofobicidade; na Fig. 10B, a carga Fv a pH 5,5; e na Fig. 10C, FvCAP a pH 5,5. Os valores de viscosidade foram obtidos em soluções tamponadas de alta força iônica na concentração de tampão arginina-HCl de 200 mM a pH 5,5.

[0019] As Figs. 11 A-E mostram gráficos de análises do componente de regressão principal (PCR) mostrando valores de viscosidade

preditos em relação aos valores de viscosidade experimentalmente observados para diversos mAbs diferentes sob condições variadas: Figs. 11A, 11B e 11E mostram a análise PCR de conjuntos de 10 mAbs diferentes. Figs. 11C e 11D mostram a análise PCR de conjuntos de 14 mAbs diferentes. Os resultados apresentados nas Figs. 11A, 11B, 11C e 11D foram obtidos sob condições de solução tampão de elevada força iônica. Os resultados mostrados na Fig. 11E foram obtidos em condições de solução tampão de baixa força iônica. As Figs. 11A e 11E mostram gráficos em uma concentração de mAb de 150 mg/mL. As Figs. 11B, 11C e 11D mostram gráficos a uma concentração de mAb de 180 mg/mL. Os valores de viscosidade preditos são valores de saída a partir da análise PCR e são descritos pelas equações descritas na seção Exemplos, abaixo, para 150 mg/mL e para 180 mg/mL de mAb. Cada ponto de dados representa um mAb e as linhas curvas, quando presentes, representam intervalos de 90% de confiança.

[0020] As Figs. 12A- 12D mostra perfis viscosidade-concentração preditos de quatro mAbs (D-A) em comparação com os seus respectivos dados experimentais. Os pontos de dados representam um valor de viscosidade determinado experimentalmente em soluções tamponadas de alta força iônica (20 mM solução tamponada a pH 5,5 com 200 mM de arginina-HCl). As linhas representam um ajuste otimizado para valores preditos. Os valores preditos foram obtidos utilizando as Equações conforme descrito na seção Exemplos para concentrações de mAb de 150 mg/mL e 180 mg/mL. As linhas foram geradas usando uma equação da forma  $y=a+be^{cx}$ , em que  $y$  é a viscosidade e  $x$  é a concentração de proteína. Esta forma de equação foi utilizada para ajustar os dados experimentais até 200 mg/mL para diversos mAb (dados não apresentados) e valores de viscosidade tão elevadas quanto 200 cP. O ajuste foi gerado utilizando os valores preditos a 150 mg/mL, 180 mg/mL e um valor de viscosidade de 1,2 para concentração de proteína de 25 mg/mL.

[0021] As Figs. 13A e 13B mostram uma relação entre a depuração de anticorpos em macacos *Cyno* e parâmetros de anticorpos calculados: Fig. 13A mostra uma relação entre a depuração de anticorpos em macacos *Cyno* e ponto isoelétrico do anticorpo calculado (em forma logarítmica, pI); e a Fig. 13B mostra uma relação entre a depuração de anticorpos em macacos *Cyno* e o Índice de hidrofobicidade calculado usando sequências CDR H1 do mAb.

[0022] As Figs. 14A-E mostram uma comparação entre o valor médio e o desvio padrão de várias propriedades extraídas a partir de simulações DM para resíduos Asp lábeis (barras tracejadas para a esquerda, ao lado esquerdo de cada figura) vs resíduos Asp estáveis (barras tracejadas para a direita, à direita de cada figura). Cada gráfico inclui a média do valor e o desvio padrão. Os valores-p calculados são mostrados em cada gráfico. RMSF, Asp SASA e SASA (N+1,N), todos demonstram uma diferença significativa (80% de intervalo de confiança (IC)) entre resíduos lábeis e estáveis. A informação Intraresíduos mútua (MI) e propriedades entropia de Shannon não diferem significativamente entre as médias dos resíduos lábeis vs. estáveis.

[0023] As Figs. 15A-15C mostram comparações dos perfis de carga-pH baseados na estrutura e baseados na sequência de domínios do fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de três mAbs diferentes do Fab pI de (A) 6,5, conforme mostrado na Fig. 15A; (B) 7,5, conforme mostrado na Fig. 15B; e (C) 9,2, conforme mostrado na Fig. 15C. Os perfis de pH-carga baseados na sequência foram calculados tal como descrito na seção Métodos Exemplares, abaixo. Os perfis de carga-pH baseados na estrutura foram calculados usando um método empírico, PROPKA e estruturas Fab. As constantes de associação individuais (forma logarítmica, pKa) de cada cadeia lateral de aminoácido carregada foram obtidas e utilizadas na equação de Henderson-Hasselbalch para se obter a carga da cadeia lateral em um

determinado pH. As cargas foram então somadas para se obter a carga líquida em um determinado pH.

[0024] A Fig. 15D exibe a distribuição de pKa de cadeias laterais carregadas no Fab utilizadas no gráfico A. O eixo dos y exibe valores de pKa, não baseados na estrutura, padrão de cadeias laterais de amino ácido D, E, H, Y, K, e R (como também marcado pelo valor ao longo do eixo-x da linha vertical associada). Cada ponto de dados horizontal para uma determinada cadeia lateral de amino ácido é o valor de pKa baseado na estrutura obtido a partir de PROPKA para aquele aminoácido. Enquanto a Fig. 15D mostra uma distribuição de valores pKa obtidos para cada cadeia lateral de aminoácido, o perfil carga-pH global com base no cálculo da carga baseada na estrutura era comparável com os cálculos da carga baseada na sequência, conforme ilustrado nas Figs. 15A-15C, em que a similaridade nos perfis de carga-pH entre sequência e estrutura foi independente do pI do Fab.

[0025] A Fig. 16 mostra uma comparação do Índice de Hidrofobicidade (HI) baseado na sequência com os valores calculados a partir da estrutura. O HI baseado na sequência foi calculado conforme descrito na seção de Métodos Exemplares, abaixo, e baseia-se na razão relativa de aminoácidos hidrofóbicos para hidrofílicos, onde cada aminoácido é ponderado por seu valor da escala de hidrofobicidade de Eisenberg. O índice de hidrofobicidade baseado na estrutura é calculado de forma semelhante, exceto que a SASA determinada a partir da estrutura está incluída no cálculo para cada um dos aminoácidos. O índice é definido como:

$$HI(\text{estrutura}) = \sum (S_i E_i / S_j E_j)$$

onde i representa os aminoácidos hidrofóbicos, ou seja, A, F, I, L, V, W, Y; e j representa os aminoácidos hidrofílicos, ou seja, D, E, G, H, K, M, N, Q, R, S, T. (para a legenda de abreviaturas de identificação de 1 letra para aminoácidos vide a Tabela 1, no texto abaixo).

S é o valor SASA e E é o valor da escala de Eisenberg de cada aminoácido. O cálculo é feito ao longo de todos os aminoácidos presentes em uma determinada sequência/estrutura. Uma correlação razoável é obtida entre o HI baseado na estrutura e o HI baseado na sequência (r de Pearson = 0,9).

[0026] A Fig. 17 exibe uma comparação dos valores de HI baseado na sequência calculados a partir de CDRs apenas para aqueles calculados a partir dos respectivos domínios Fv para diversos mAbs da subclasse/classe de estudo, IgG1. Valores HI calculados usando CDRs bem correlacionados com os obtidos usando Fv (r de Pearson = 0,9).

[0027] A Fig. 18 exibe um aparelho ilustrativo que pode ser configurado de acordo com os princípios da invenção.

[0028] As Figs. 19A e 19B são um fluxograma de processos ilustrativos de acordo com os princípios da invenção.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0029] São fornecidos aparelhos, métodos, artigos de manufatura, e meios legíveis por computador (suporte eletrônico) correspondentes para determinar se um anticorpo tem uma ou mais características físico-químicas que satisfazem um ou mais critérios de projeto correspondentes. Para qualquer uma das uma ou mais características físico-químicas, a determinação pode ser um substituto para uma determinação empírica de um valor da característica físico-química. O substituto pode ser uma predição do valor na ausência, ou antes, ou ao invés, de uma determinação empírica. Os valores de determinações empíricas e valores de predições e condições de solução sob as quais as determinações e previsões podem ser executadas podem ser aproximados.

[0030] Um ou mais critérios de projeto pode ser para um agente terapêutico que compreende um anticorpo. O um ou mais critérios de projeto pode ser para um anticorpo para uso *in vitro* ou *in vivo*. O um ou mais critérios

de projeto pode ser para uma composição, uma formulação farmacêutica ou uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo. A determinação pode ser uma determinação da aptidão ou adequação do anticorpo para inclusão no agente terapêutico ou para a inclusão em uma formulação farmacêutica ou composição farmacêutica.

[0031] O termo “agente terapêutico” refere-se a um agente que em uma quantidade eficaz exerce um efeito terapêutico desejável em um animal, preferencialmente um mamífero, mais preferivelmente um primata, com maior preferência um humano. Um agente terapêutico pode ser formulado em uma composição farmacêutica, que pode compreender mais do que um tipo de agente terapêutico.

[0032] O agente terapêutico que compreende um anticorpo pode ser para injeção intravenosa, injeção subcutânea, injeção intraperitoneal ou qualquer outra forma de administração. O agente terapêutico pode estar em concentração elevada em pequeno volume de injeção subcutânea utilizando um dispositivo de distribuição. O agente terapêutico pode necessitar de baixa viscosidade. O agente terapêutico pode ser concebido para a dosagem não frequente e pode necessitar de uma meia-vida prolongada no plasma.

[0033] Um “critério de design / critério de design” de um agente terapêutico pode se referir a uma característica física, química ou físico-química -alvo que agente terapêutico deve ter.

[0034] São fornecidos aparelhos e métodos, e meios legíveis por computador (suporte eletrônico) correspondentes para selecionar o anticorpo para uso no agente terapêutico. O meio de armazenamento legível por computador (suporte eletrônico) pode incluir ondas não transitórias. Os meios de armazenamento legível por computador (suporte eletrônico) pode incluir sinais não transitórios. O anticorpo pode ser selecionado a partir de dois ou mais anticorpos candidatos.

[0035] São fornecidos aparelhos e métodos e meios legíveis por computador (suporte eletrônico) correspondentes para a produção ou fabricação do anticorpo. O anticorpo obtido pode ser para uso em um agente terapêutico. O anticorpo obtido pode ser modificado a partir de um anticorpo pré-existente. O anticorpo pré-existente pode ser modificado para produzir um anticorpo-alvo que satisfaz um ou mais critérios de projeto. Os critérios de projeto podem ser para um agente terapêutico.

[0036] O aparelho pode executar uma ou mais etapas dos métodos. O aparelho pode incluir um dispositivo de processamento lógico. O aparelho pode incluir um dispositivo de recepção de dados. O aparelho pode incluir um dispositivo de transmissão de dados. O aparelho pode incluir memória legível por máquina. Dois ou mais dos dispositivos podem estar em comunicação eletrônica entre si.

[0037] A mídia ou suporte eletrônico pode ser uma ou mais mídia utilizável em computador não transitória. A mídia utilizável em computador pode ter o código de programa informático incorporado nela. O código de programa informático, quando executado por um ou mais processadores, pode fazer com que um sistema de computador realize as etapas dos métodos.

[0038] As etapas podem ser executadas para determinar a aptidão ou adequação do anticorpo para inclusão no agente terapêutico. As etapas podem ser executadas para selecionar o anticorpo a partir de diversos anticorpos candidatos. As etapas podem ser executadas para a produção do anticorpo. As etapas podem ser executadas para modificar o anticorpo pré-existente. As etapas podem ser executadas para modificar o anticorpo pré-existente para produzir o anticorpo-alvo.

[0039] Algumas ou todas as etapas podem ser executadas em conjunto entre si com base em uma das características físico-químicas, ou uma combinação de duas ou mais das seguintes características físico-químicas para

combinar um ou mais dos seguintes: determinação da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico; seleção do anticorpo a partir de diversos anticorpos candidatos; fabricação do anticorpo; modificação do anticorpo pré-existente para gerar um anticorpo alvo; e produção do anticorpo alvo.

[0040] As características físico-químicas do anticorpo; informação estrutural do anticorpo; parâmetros estruturais do anticorpo; critérios de projeto; funções objetivas; fatores de escala de função objetiva; índices das características físico-químicas; anticorpos; produção de anticorpos; dispositivos de processamento lógicos, dispositivos de transmissão de dados e recepção de dados; e combinação de características e princípios da invenção serão discutidos agora.

#### **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ANTICORPO**

[0041] As características físico-químicas exemplares incluem viscosidade, depuração, estabilidade, labilidade do ácido aspártico e labilidade do triptofano.

[0042] A característica físico-química pode ser uma viscosidade. A característica físico-química pode ser uma taxa de depuração farmacocinética. A característica físico-química pode ser uma labilidade. A labilidade pode corresponder a uma estabilidade do anticorpo. A labilidade pode corresponder à validade (vida útil) do anticorpo.

[0043] A característica físico-química pode ser uma estabilidade. A característica físico-química pode ser uma validade (vida útil). A característica físico-química pode ser uma labilidade do ácido aspártico (Asp). A característica físico-química pode ser uma labilidade do triptofano (Trp). A labilidade do Asp pode corresponder à isomerização do Asp. A labilidade do Trp pode corresponder à oxidação do Trp. A labilidade pode afetar a estabilidade e a validade do anticorpo.

[0044] A característica físico-química pode depender de uma

condição da solução. A condição da solução pode ser uma condição da solução aquosa. A condição da solução pode ser uma temperatura. A condição pode ser pH. A condição da solução pode ser uma força iônica. A condição pode ser uma a concentração de anticorpos. A força iônica de uma solução aquosa de anticorpo pode ser ajustada ao todo ou em parte, pela concentração de uma solução tampão iônica na qual o anticorpo está presente. Um exemplo de uma solução tampão iônica pode ser uma solução tampão de Histidina-acetato. A condição da solução pode incluir a concentração de soluto. A concentração de soluto pode incluir concentração de anticorpo.

#### **INFORMAÇÃO ESTRUTURAL DO ANTICORPO**

[0045] A informação estrutural do anticorpo pode ser utilizada para calcular os parâmetros estruturais. Os métodos podem incluir o cálculo dos parâmetros estruturais a partir da informação estrutural do anticorpo.

[0046] A informação estrutural pode corresponder a uma estrutura tridimensional. A informação estrutural pode corresponder a uma estrutura primária. A estrutura primária pode referir-se a sequência de aminoácidos primária. A estrutura primária pode incluir a estrutura primária de um domínio variável do anticorpo. A estrutura primária pode ser exclusivamente a estrutura primária do domínio variável. A estrutura primária pode incluir uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve (VL). A estrutura primária pode incluir uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada (VH). A estrutura primária pode incluir uma ou mais sequências de aminoácidos da CDR. A estrutura primária pode incluir a estrutura primária de uma região constante do anticorpo. A estrutura primária da região constante pode incluir uma sequência de aminoácidos da região constante de cadeia leve (CL). A estrutura primária da região constante pode incluir uma sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada (CH). A estrutura primária da região constante pode incluir um ou mais das sequências de amino ácido da

região constante de cadeia pesada CH1, CH2 e CH3.

[0047] Um parâmetro estrutural pode ser calculado a partir da informação estrutural primária, e pode não conter informação a partir de fontes diferentes que não seja da estrutura primária. A sequência primária pode ser derivada da sequência de DNA obtida pelo sequenciamento do DNA. A técnica de sequenciamento do DNA é bem conhecida no estado da técnica.

[0048] A informação estrutural de anticorpo pode ser codificada eletronicamente. A informação codificada eletronicamente pode ser armazenada na memória legível por máquina. O dispositivo de processamento lógico pode recuperar a informação estrutural de anticorpos a partir da memória legível por máquina. O dispositivo receptor de dados pode receber a informação estrutural do anticorpo. O dispositivo de processamento lógico pode calcular os parâmetros físico-químicos da informação estrutural do anticorpo. O dispositivo de transmissão de dados pode transmitir a informação estrutural do anticorpo. O dispositivo de transmissão de dados pode transmitir um sinal correspondente a um resultado dos cálculos.

[0049] O termo “codificado eletronicamente” refere-se a uma forma de informação adequada para o armazenamento, e recuperação, a partir de uma base de dados eletrônica e/ou para a manipulação por um dispositivo de computação eletrônica.

#### **PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO ANTICORPO**

[0050] O parâmetro estrutural pode ser uma carga líquida do anticorpo. O parâmetro estrutural pode ser uma assimetria de carga do anticorpo. O parâmetro estrutural pode ser uma hidrofobicidade do anticorpo. O parâmetro estrutural pode ser calculado a partir de informações estruturais do anticorpo.

[0051] A informação estrutural do anticorpo pode incluir a informação da estrutura primária, por exemplo, a sequência de aminoácidos do

anticorpo. A sequência de aminoácidos pode ser a sequência de aminoácidos de um elemento estrutural de um anticorpo. Cada um dos elementos estruturais pode ser uma sequência de aminoácidos. Os elementos estruturais podem ser adjacentes entre si na sequência de aminoácidos do anticorpo. Os elementos estruturais podem ser próximos entre si na sequência do anticorpo. Os elementos estruturais podem estar associados entre si no anticorpo. O elemento estrutural pode ser o domínio variável de cadeia pesada (VH) e/ou o domínio variável de cadeia leve (VL). O elemento estrutural pode ser uma ou mais regiões determinantes de complementariedade (CDRs). O elemento estrutural pode ser uma ou mais regiões constantes (por exemplo, CH1, CL, CH2 e CH3). O elemento estrutural pode ser a cadeia pesada e cadeia leve (metade de anticorpo). O elemento estrutural pode ser o anticorpo inteiro. A sequência de aminoácidos primária pode ser a sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada (VH), e/ou o domínio variável de cadeia leve (VL). A sequência de aminoácidos primária pode ser a sequência de aminoácidos de uma ou mais CDRs. A sequência de aminoácidos primária pode ser a sequência de aminoácidos de uma ou mais regiões constantes do anticorpo. As informações de estrutura do anticorpo também podem incluir informações de estrutura secundárias e informações estruturais de nível superior, como informações a respeito de interações moleculares tridimensionais que podem contribuir para a viscosidade, depuração e estabilidade.

[0052] Os parâmetros estruturais podem incluir uma carga líquida. A carga líquida pode ser a soma das cargas de todos os aminoácidos dentro de um elemento estrutural do anticorpo. A carga líquida pode ser a soma das cargas de todos os aminoácidos dentro de um elemento estrutural do anticorpo em um determinado pH. O pH pode ser um valor de pH entre pH 4 e pH 9. O pH pode ser pH 5,5. Um elemento estrutural pode ser os domínios VH e VL. A

carga líquida pode ser a soma das cargas de todos os aminoácidos dentro dos domínios VH e VL. A carga líquida pode ser a soma das cargas de todos os aminoácidos dentro de uma ou mais CDRs. A carga líquida pode ser a soma das cargas de todos os aminoácidos dentro de uma ou mais regiões constantes.

[0053] Os parâmetros estruturais podem incluir uma assimetria de carga. A assimetria de carga pode ser um produto da carga líquida de um elemento estrutural do anticorpo e uma carga líquida de pelo menos outro elemento estrutural do anticorpo. A assimetria de carga pode ser um produto da carga líquida do VH e carga líquida do VL do anticorpo. Além disso, a assimetria de carga pode ser um produto, por exemplo, da carga líquida do Fv e Fc, ou domínio Fv e CH3, ou Fab e Fc, etc.

[0054] Os parâmetros estruturais podem incluir uma hidrofobicidade. A hidrofobicidade pode incluir um total de funções somatórias de valores de hidrofobicidade correspondentes a uma ou mais CDRs. Cada função somatória pode ser uma razão de: (1) uma soma dos valores de hidrofobicidade dos resíduos hidrofóbicos de uma CDR; e (2) a soma dos valores de hidrofobicidade dos resíduos hidrofílicos da CDR. O valor de hidrofobicidade para cada resíduo de aminoácido da CDR pode ser um valor de escala de hidrofobicidade de Eisenberg. Alternativamente, a hidrofobicidade pode incluir um valor de hidrofobicidade Fv.

[0055] Os parâmetros estruturais podem ser calculados usando simulações de dinâmica molecular (MD). As simulações MD podem corresponder a um conjunto de condições de solução simulado. O conjunto pode incluir condições de solução de uma solução virtual. As condições de solução simuladas podem incluir a temperatura. As simulações de MD podem ser mantidas em uma temperatura. As condições de solução simuladas podem incluir moléculas de água virtuais. As simulações de MD podem empregar

solvatação de água explícita. As condições de solução simuladas podem incluir íon soluto virtual para manter a neutralidade.

[0056] As simulações de MD podem calcular uma raiz quadrada média de flutuação de um alfa-carbono ( $\alpha$ -carbono) de um resíduo de aminoácido (na posição "N") (RMSF). O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo do aminoácido/sequência VH e/ou VL. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo em uma sequência de aminoácido da CDR. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo de uma região estrutural/de arcabouço (*framework* - FR) humana. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo de ácido aspártico. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo de triptofano. O resíduo de aminoácido pode ser qualquer resíduo potencialmente lábil.

[0057] Os parâmetros estruturais podem incluir uma média temporal SASA de um resíduo de aminoácido. As simulações por MD podem calcular uma média temporal SASA do resíduo. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo de ácido aspártico. O resíduo de amino ácido pode ser um resíduo de triptofano. O resíduo de aminoácido pode ser um resíduo de aminoácido imediatamente adjacente a um resíduo potencialmente lábil.

[0058] Os parâmetros estruturais podem incluir uma média temporal SASA de um átomo de nitrogênio de cadeia principal imediatamente adjacente ao resíduo de aminoácido que ocupa a posição N. As simulações por MD podem calcular uma média temporal SASA de um átomo de nitrogênio da cadeia principal imediatamente adjacente ao resíduo na posição N na sequência de aminoácido. O resíduo de amino ácido na posição N pode ser um resíduo Asp. "Imediatamente adjacente" pode ser definido como adjacente ao longo da sequência de aminoácido em uma direção ou amino-terminal (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal) da sequência de aminoácidos. O resíduo de aminoácido imediatamente adjacente ao resíduo no resíduo da posição N pode ser adjacente ao longo da sequência de aminoácidos na

direção C-terminal da sequência de aminoácidos (ou seja, na posição “N+1”). Por exemplo, se o resíduo é um resíduo de ácido aspártico ocupando posição “N”, a posição “N+1” pode ser a posição do resíduo imediatamente adjacente ao resíduo de ácido aspártico ao longo da sequência de aminoácidos na direção C-terminal da sequência de aminoácidos. O resíduo em “N+1” pode ser glicina. O resíduo em “N+1” pode ser treonina. O resíduo em “N+1” pode ser ácido aspártico. O resíduo em “N+1” pode ser alanina. O resíduo em “N+1” pode ser qualquer resíduo.

[0059] As simulações por MD podem calcular diferentes valores dos parâmetros estruturais para diferentes condições de solução.

#### **CRITÉRIOS DE PROJETO**

[0060] Cada uma das características físico-químicas pode ter um critério de design correspondente. O critério de design pode ser um limite, um limiar ou um valor corte. Conforme descrito abaixo, dependendo das características físico-químicas e funções objetivas correspondentes, quando um índice correspondendo à característica físico-química está abaixo do limite, acima do limite, não excedendo o limite, e não menor do que o limite, o critério de design pode ser considerado satisfeito. Em determinados exemplos de realização específicos, o índice correspondendo à característica físico-química está abaixo do limite. Dependendo das características físico-químicas e funções objetivas, o índice pode ainda ser convertido, por exemplo, para dar uma indicação binária que sinaliza ou não se a característica físico-química do anticorpo satisfaz o critério de design.

[0061] O critério de design pode ser um limite de viscosidade. O critério de design pode ser um limite da taxa de depuração farmacocinética. O critério de design pode ser limite de labilidade. O critério de design pode ser um limite de labilidade do ácido aspártico. O critério de design pode ser limite de labilidade do triptofano. O critério de design pode ser limite de estabilidade. O

critério de design pode ser um limite de validade (vida útil). O critério de design pode ser para um agente terapêutico. O critério de design pode ser para um agente não terapêutico. O critério de design pode ser para uma composição que inclui o anticorpo. A composição pode ser uma composição para aplicação *in vivo* ou *in vitro*.

[0062] O critério de design pode ser para uma determinada classe (ou subclasse) de anticorpo. A classe pode ser IgG. A classe (subclasse) pode ser IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>4</sub>.

[0063] O critério de design pode ser um critério associado com a fabricação do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a transferência de fluido do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com o armazenamento do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a validade (vida útil) do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a administração fabricação do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a meia-vida plasmática do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a taxa de depuração do anticorpo. O critério de design pode ser um critério associado com a distribuição do anticorpo. O critério de design pode ser para um agente terapêutico que inclui o anticorpo. A administração ou distribuição do agente terapêutico pode ser autoadministrada pelo paciente. A administração pode ser intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea.

#### **FUNÇÕES OBJETIVAS**

[0064] Em determinados aspectos, a invenção provê métodos para determinar se um anticorpo tem uma característica físico-química que satisfaz um critério de design. Os métodos podem incluir a quantificação ou o cálculo de um índice a partir de uma função objetiva que corresponde a uma característica físico-química. A função objetiva pode incluir um valor de um parâmetro estrutural calculado conforme descrito ao longo do pedido.

[0065] A função objetiva pode incluir uma somatória de produtos multiplicativos de valores e fatores de escalonamento de função objetiva e parâmetros estruturais correspondentes. A soma pode ser incluída em um argumento de um termo exponencial na função objetiva. A função objetiva pode produzir a predição de um valor da característica físico-química, que pode ser comparada com o critério de design. Por exemplo, a função objetiva viscosidade pode compreender a somatória de produtos multiplicativos de valores de parâmetros estruturais baseados na sequência de acordo com a invenção e de fatores de escalonamento da função objetiva correspondente, onde os atributos estruturais do mAb que contribuem para a viscosidade podem ser carga líquida, assimetria de carga e hidrofobicidade de pelo menos uma porção do domínio variável do anticorpo. O cálculo da função objetiva produz um índice de viscosidade. O índice pode ser convertido em um valor de viscosidade e a comparação do valor da viscosidade e o limite de viscosidade definido pelo critério de design pode ser utilizado para determinar se o anticorpo tem uma viscosidade que satisfaz o critério de design.

[0066] Os parâmetros estruturais e os fatores de escalonamento correspondentes de uma função objetiva particular podem depender da classe (ou subclasse) do anticorpo. Por exemplo, a função objetiva 'viscosidade' descrita no parágrafo anterior pode ser utilizada para a predição da viscosidade de um anticorpo IgG<sub>1</sub>, ao passo que para um anticorpo IgG<sub>4</sub>, a somatória pode compreender ainda um produto de uma carga líquida da região constante ou uma assimetria carga da região constante e um fator de escalonamento da função objetiva correspondente, de acordo com as características físico-químicas do anticorpo de interesse.

[0067] A função objetiva pode produzir um valor que não corresponde a um valor que é diretamente relacionável ou conversível para uma característica físico-química; entretanto, o valor pode indicar se o

anticorpo tem uma característica físico-química que satisfaz um critério de design. O valor pode ser convertido a um código binário que indica se o anticorpo tem ou não uma característica físico-química que satisfaz um critério de design. Por exemplo, um índice de entre zero e um calculado a partir da função objetiva 'labilidade do ácido aspártico' pode ser arredondado para um número único significativo para a produção de um segundo índice, em que o anticorpo é determinado como um anticorpo que satisfaz o critério de design de labilidade do ácido aspártico quando o segundo índice é zero, e não satisfaz o critério de design de labilidade do ácido aspártico quando o segundo índice é um.

[0068] O dispositivo de processamento lógico pode derivar o índice pelo processando do cálculo da função objetiva.

[0069] A função objetiva pode ter a forma de qualquer função polinomial ou função densidade de probabilidade adequada empregada, modificada e/ou derivada pelos métodos analíticos matemáticas implementados no presente.

[0070] Funções objetivas correspondentes às diferentes características físico-químicas podem ter diferentes formas funcionais.

#### **FATORES DE ESCALONAMENTO DA FUNÇÃO OBJETIVA**

[0071] Os métodos podem incluir a seleção dos fatores de escalonamento. A seleção dos fatores de escalonamento pode incluir a seleção dos fatores de escalonamento a partir de um conjunto de fatores de escalonamento. "Fatores de escalonamento" também podem ser referidos como "coeficientes".

[0072] Conjuntos de fatores de escalonamento podem incluir fatores de escalonamento para cada de uma ou mais classes de anticorpos. A classe de anticorpo pode incluir anticorpos IgG, IgA, IgE, IgM e IgD. A classe de anticorpo também pode incluir subclasses; exemplos não limitantes de

subclasse incluem IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. A classe do anticorpo pode ser IgG. A classe do anticorpo pode ser IgG<sub>1</sub>. A classe do anticorpo pode ser IgG<sub>4</sub>.

[0073] O conjunto de fator de escalonamento pode incluir para cada classe (ou subclasse) um conjunto de fatores de escalonamento para cada de uma ou mais condições de solução. As condições da solução podem ser condições de solução simuladas, podendo ser utilizadas simulações de MD. As condições de solução podem ser condições de solução reais por 'via úmida'.

[0074] O conjunto de fatores de escalonamento pode incluir para cada classe (ou subclasse), e para cada condição de solução, um fator de escalonamento correspondente a cada um dos parâmetros estruturais.

[0075] O conjunto de fatores de escalonamento pode ser armazenado na memória legível por máquina. O dispositivo de processamento lógico pode selecionar os fatores de escalonamento. A seleção dos fatores de escalonamento pode incluir a recuperação dos fatores de escalonamento a partir da memória legível por máquina. O dispositivo de processamento lógico pode recuperar os fatores de escalonamento a partir da memória legível por máquina.

[0076] A seleção dos fatores de escalonamento pode incluir a derivação dos fatores de escalonamento. Os fatores de escalonamento podem ser obtidos pelo ajuste da função objetiva em valores empíricos das características físico-químicas de um conjunto de anticorpos de teste. Os fatores de escalonamento podem ser coeficientes ou constantes obtidos pela regressão de valores calculados a partir de parâmetros estruturais compreendendo uma função objetiva em relação aos valores mensurados a partir das características físico-químicas de um conjunto de treino de anticorpos (também referido como "anticorpos-teste") sob cada uma das diferentes condições de solução. Os fatores de escalonamento podem ser obtidos por quaisquer outros meios de ajuste dos parâmetros estruturais que

compreendem uma função objetiva para os valores mensurados das características físico-químicas. O dispositivo de processamento lógico pode ajustar os parâmetros estruturais de uma função objetiva para os valores mensurados das características físico-químicas. Uma vez derivado, o mesmo conjunto de fatores de escalonamento pode ser aplicado para a predição da viscosidade ou isomerização de Asp ou outras características físico-químicas de anticorpos da mesma classe ou subclasse e sob as mesmas condições.

[0077] Os valores mensurados podem ser valores empíricos. Os valores mensurados podem ser publicamente documentados ou valores publicados. Os valores mensurados podem ser codificados eletronicamente. Os valores mensurados podem ser armazenados na memória legível por máquina.

#### **ÍNDICES DE CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICAS**

[0078] Para uma ou mais das seguintes características físico-químicas, um índice pode ser calculado a partir das funções objetivas correspondentes. O índice pode corresponder à característica físico-química. O índice pode ser comparado com o critério de design.

[0079] O índice pode ser calculado eletronicamente. O termo “calculado eletronicamente” ou “quantificado eletronicamente” pode se referir a derivação computacional por um dispositivo de computação eletrônica, tal como o dispositivo de processamento lógico.

[0080] O dispositivo de processamento lógico pode realizar o cálculo. O dispositivo de processamento lógico pode realizar a comparação. O dispositivo de transmissão de dados pode emitir uma indicação de que o índice satisfaz o critério de design.

[0081] O dispositivo de processamento lógico pode selecionar o anticorpo a partir de dois ou mais anticorpos candidatos com base nos índices correspondentes aos anticorpos candidatos. A seleção pode selecionar o anticorpo candidato cujo índice está em conformidade com, ou melhor

respeitar, o limite de uma característica físico-química ou o critério de design.

[0082] O índice pode ser a base para determinar se será feita a fabricação ou produção do anticorpo.

[0083] O índice pode ser a base para a determinação se um anticorpo pré-existente deve, ou como se deve, ser modificado. O índice pode ser a base para a modificação do anticorpo pré-existente, para produzir o anticorpo alvo possuindo uma ou mais características físico-químicas que são melhoradas em relação ao anticorpo pré-existente e/ou com características que satisfazem um ou mais critérios de projeto.

#### **ANTICORPOS**

[0084] Um ou mais dentre o anticorpo, anticorpos teste, anticorpos candidatos, anticorpo pré-existente e anticorpo alvo pode incluir um anticorpo monoclonal (mAb), um anticorpo policlonal, um anticorpo de classe alterada ou qualquer outro tipo de anticorpo.

[0085] Um ou mais dentre o anticorpo, anticorpos teste, anticorpos candidatos, anticorpo pré-existente e anticorpo alvo pode incluir um fragmento de anticorpo, um fragmento variável de anticorpo de cadeia única, um anticorpo de domínio único, ou qualquer outro tipo ou fragmento de anticorpo.

[0086] Um ou mais dentre o anticorpo, anticorpos teste, anticorpos candidatos, anticorpo pré-existente e anticorpo alvo pode incluir um anticorpo humano, um anticorpo não humano, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo manipulado, um anticorpo artificial ou qualquer outro tipo de anticorpo.

[0087] Um ou mais dentre o anticorpo, anticorpos teste, anticorpos candidatos, anticorpo pré-existente e anticorpo alvo pode pertencer a uma classe de anticorpo. A classe pode ser IgG, IgM ou qualquer outra classe adequada. A classe pode ser uma classe alterada. A classe pode incluir

uma ou mais subclasses. A subclasse pode ser IgG<sub>1</sub>. A subclasse pode ser IgG<sub>4</sub>. A subclasse pode ser qualquer subclasse.

[0088] O termo “anticorpo” na presente invenção é utilizado no sentido mais amplo e abrange diferentes estruturas de anticorpo, incluindo, mas não se limitando, a anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos. Um “fragmento de anticorpo” refere-se a uma molécula que não é um anticorpo intacto, que compreende uma porção de um anticorpo intacto que se liga ao antígeno ao qual o anticorpo intacto se liga.

[0089] O termo “região variável” ou “domínio variável” refere-se ao domínio de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo que está envolvido na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis da cadeia pesada e cadeia leve (VH e VL, respectivamente) de um anticorpo geralmente têm estruturas similares, com cada domínio compreendendo quatro regiões de arcabouços (*frameworks* - FRs) conservadas e três regiões hipervariáveis (HVRs ou CDRs). (Vide, por exemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman & Co., página 91 (2007)). Um único domínio VH ou VL pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação ao antígeno.

[0090] O termo “região hipervariável” ou “HVR” conforme utilizado no presente refere-se a cada uma das regiões de um domínio variável de anticorpo que é hipervariável na sequência (“região determinante de complementaridade” ou “CDRs”) e/ou forma alças (*loops*) estruturalmente definidas (“alças hipervariáveis”) e/ou contém resíduos de contato ao antígeno (“contato ao antígeno”). Geralmente, os anticorpos compreendem seis HVRs: sendo três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3).

[0091] “Região de arcabouço” ou “região estrutural” ou “FR” (de *framework*) referem-se aos resíduos de domínios variáveis que não sejam resíduos da HVR. A FR de um domínio variável consiste geralmente em quatro

domínios FR: FR1, FR2, FR3 e FR4. Assim, as sequências HVR e FR geralmente aparecem na seguinte sequência na VH (ou VL): FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4.

[0092] Um “anticorpo humano” é aquele que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde ao de um anticorpo produzido por um ser humano ou uma célula humana ou derivado de uma fonte não humana que utiliza repertórios de anticorpos humanos ou outras sequências codificantes de anticorpos humanos. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado, que compreende resíduos não humanos de ligação ao antígeno.

[0093] Um anticorpo “humanizado” refere-se a um anticorpo quimérico compreendendo resíduos de aminoácidos a partir de HVRs não humanas e resíduos de aminoácidos a partir de FRs humanas. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo humanizado compreenderá de substancialmente todos dentre pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as HVRs (por exemplo, CDRs) correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs correspondem àquelas de um anticorpo humano. Um anticorpo humanizado pode compreender, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante do anticorpo derivado de um anticorpo humano. Uma “forma humanizada” de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo não humano, refere-se a um anticorpo que foi submetido à humanização.

[0094] O termo “anticorpo monoclonal” conforme utilizado no presente refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, ou seja, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos e/ou se ligam ao(s) mesmo(s) epítopo(s), exceto por possíveis anticorpos variantes, por exemplo, contendo

mutações de ocorrência natural ou que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estão presentes em pequenas quantidades. Ao contrário das preparações com anticorpo policlonal, que incluem tipicamente diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é direcionado a um único determinante sobre um antígeno. Portanto, o adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como uma necessidade de se produzir o anticorpo por qualquer método específico.

[0095] A “classe” de um anticorpo refere-se ao tipo de domínio constante ou região constante presente em sua cadeia pesada. Existem cinco classes principais de anticorpos de mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Conforme utilizado na presente invenção, “classes” de anticorpos incluem amplamente classes e subclasses de anticorpos.

#### **PRODUÇÃO DE ANTICORPO**

[0096] Em determinados aspectos, a invenção provê adicionalmente métodos de produção de um anticorpo, em que o anticorpo obtido é determinado com possuindo uma ou mais características físico-químicas que satisfazem um ou mais critérios de projeto. A invenção pode fornecer métodos de produção de um anticorpo alvo que é modificado a partir de um anticorpo pré-existente que não satisfaz os critérios de projeto de modo que o anticorpo modificado (ou seja, o anticorpo alvo produzido) tenha uma ou mais características físico-químicas que satisfazem um ou mais critérios de projeto. A produção pode ser para preparação de anticorpos de pequena escala ou para a fabricação de anticorpos em larga escala.

[0097] O anticorpo produzido pode ser adicionalmente incluído em uma composição farmacêutica. As formulações farmacêuticas de um anticorpo são preparadas pela mistura de tal anticorpo possuindo o grau de pureza desejado com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Um “veículo farmacêuticamente aceitável” refere-se a um ingrediente em uma formulação farmacêutica que não seja um ingrediente ativo e que não seja tóxico para um sujeito. Um veículo farmacêuticamente aceitável inclui, mas não está limitado a, um tampão, excipiente, estabilizante ou conservante.

[0098] A presente formulação também pode conter mais de um ingrediente ativo de acordo com a necessidade para a indicação específica a ser tratada, preferencialmente com aqueles ingredientes que possuem atividades complementares que não atuem de maneira prejudicial entre si. Tais ingredientes ativos estão adequadamente presentes na combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

[0099] As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* são geralmente estéreis. A esterilização pode ser facilmente obtida, por exemplo, por meio da filtração através de membranas de filtração estéreis.

[0100] Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos por uma variedade de técnicas, incluindo, mas não se limitando aos métodos de hibridoma, métodos de DNA recombinante, métodos de exibição por fago, e métodos que utilizam animais transgênicos contendo a totalidade ou parte dos *loci* de imunoglobulinas humanas.

[0101] Os anticorpos podem ser produzidos por quaisquer métodos conhecidos no estado da técnica. O anticorpo pode ser produzido por um método de cultura de uma célula hospedeira que compreende o ácido

nucleico que codifica o anticorpo sob condições adequadas para expressar o anticorpo. O anticorpo pode ser produzido de modo recombinante na célula hospedeira. A célula hospedeira pode ser uma célula procariótica (incluindo, mas não se limitando a, uma célula de *E. coli*) ou uma célula eucariótica (incluindo, mas não se limitando a, uma célula SF9 ou célula de mamífero tal como uma célula de ovário de hamster chinês). O anticorpo pode ser produzido por uma célula transfectada de maneira transitória ou linhagem de células transfectada de forma estável. O anticorpo pode ser produzido em um animal transgênico. O anticorpo pode ser produzido por qualquer método sintético conhecido no estado da técnica. O anticorpo pode ser obtido por purificação utilizando métodos padrão, como os métodos de cromatografia.

[0102] O termo “anticorpo pré-existente” pode referir-se ao anticorpo do qual a sequência de aminoácidos é modificada de modo que uma ou mais características físico-químicas, determinadas de acordo com a presente invenção, são melhoradas e/ou satisfazem um ou mais critérios de projeto. O anticorpo pré-existente pode ter aceitável especificidade de ligação ao antígeno, afinidade e outras atividades efectoras. O anticorpo pré-existente pode ter características físico-químicas indesejáveis ou inaceitáveis, conforme determinado pela presente invenção.

[0103] Os termos “anticorpo alvo”, “anticorpo modificado” ou “anticorpo mutagenizado” podem ser utilizados de maneira indiferente. Estes termos podem referir-se a um anticorpo com uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente, de modo que o anticorpo alvo, modificado ou mutado tem uma ou mais características físico-químicas que satisfazem um ou mais critérios de projeto, e ao mesmo tempo mantém, pelo menos substancialmente, a afinidade de ligação ao antígeno, especificidade e outras atividades desejáveis, tais como citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e outras atividades efectoras do

anticorpo pré-existente. O anticorpo alvo, modificado ou mutagenizado, pode apresentar uma ou mais propriedades superiores ao anticorpo pré-existente, por exemplo, melhora da afinidade de ligação ao antígeno, especificidade e/ou outras atividades desejadas.

[0104] A modificação do anticorpo pré-existente pode incluir a modificação de uma sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente. A sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente pode ser modificada para estar de acordo com uma sequência de aminoácidos alvo que está em conformidade com o critério de design.

[0105] A modificação da sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente pode incluir o ajuste de um ou mais aminoácidos em uma sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente. O ajuste de um ou mais resíduos de aminoácidos pode incluir a modificação química de um ou mais resíduos. A modificação química de um ou mais resíduos pode incluir alterações na quiralidade de um ou mais resíduos. A modificação química de um ou mais resíduos pode incluir a alteração de um ou mais átomos de um ou mais resíduos.

[0106] A modificação da sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente pode incluir a substituição ou troca de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácido pré-existente do anticorpo com um resíduo de aminoácido diferente. A modificação da sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente pode incluir a deleção de um ou mais resíduos de aminoácidos a partir de uma sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente. A modificação da sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente pode incluir a adição ou inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos do anticorpo pré-existente.

[0107] Uma substituição de um aminoácido pode ser uma substituição conservadora ou uma substituição não conservadora. É

geralmente compreendido no estado da técnica o que constitui substituições de aminoácidos conservadoras ou não conservadoras. Substituições conservadoras são exibidas na Tabela 1 abaixo sob o título de “substituições preferidas”. Alterações mais substanciais são fornecidas na Tabela 1 sob o título de “substituições exemplares”, e conforme descrito abaixo em referência às classes de cadeias laterais de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem ser introduzidas no anticorpo pré-existente para produzir um anticorpo modificado, ou seja, um anticorpo alvo. O anticorpo modificado pode ser rastreado para um atributo desejado, por exemplo, uma característica físico-química desejada, além da retenção dos atributos desejados do anticorpo pré-existente.

**TABELA 1**

Resíduo Original (abreviação de 1 letra)	Substituições Conservadoras Exemplares	Substituições Conservadoras Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lis; Gln; Asn	Lis
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lis; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cis (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gli (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lis; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Fen; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fen	Ile
Lis (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Fen; Ile	Leu

Resíduo Original (abreviação de 1 letra)	Substituições Conservadoras Exemplares	Substituições Conservadoras Preferidas
<b>Fen (F)</b>	<b>Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir</b>	Tir
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Tre	Tre
<b>Tre (T)</b>	<b>Val; Ser</b>	Ser
Trp (W)	Tir; Fen	Tir
Tir (Y)	Trp; Fen; Tre; Ser	Fen
Val (V)	Ile; Leu; Met; Fen; Ala; Norleucina	Leu

[0108] Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as propriedades comuns da cadeia lateral:

- (1) Hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cis, Ser, Tre, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu
- (4) básico: His, Lis, Arg;
- (5) resíduos que influenciam na orientação das cadeias: Gli, Pro; e
- (6) aromático: Trp, Tir, Fen.

[0109] Substituições não conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe. Pode estar dentro da capacidade de um investigador aumentar ou diminuir a carga líquida ou hidrofobicidade de acordo com a presente invenção pela substituição de um ou mais resíduos de aminoácido na sequência do anticorpo, de modo que o anticorpo pode ter uma propriedade físico-química que satisfaz um critério de design. Por exemplo, uma substituição de um resíduo de aminoácido básico por um resíduo de aminoácido ácido ou neutro pode diminuir a carga líquida calculada, e uma substituição de um resíduo de aminoácido hidrofílico por um resíduo de aminoácido hidrofóbico pode aumentar a hidrofobicidade calculada,

de um índice relevante como base para determinar se o anticorpo satisfaz um determinado critério de design. O anticorpo alvo, modificado ou mutado pode ser submetido a mais análises *in silico* ou análise experimental úmida para confirmar que o anticorpo alvo, modificado ou mutado tem pelo menos uma propriedade físico-química que satisfaz um critério de design.

[0110] O anticorpo alvo, modificado ou mutado pode ser submetido à análise adicional para garantir que o anticorpo modificado mantém pelo menos substancialmente uma atividade desejada do anticorpo pré-existente, tal como a especificidade de ligação ao antígeno ou afinidade, utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, a especificidade de ligação ao antígeno, afinidade de ligação ao antígeno e cinética de ligação podem ser mensuradas por ELISA, imunoenensaio baseado em fluorescência, radioimunoensaio ou ensaio BIACORE® (Biacore AB, Uppsala, Suécia).

[0111] O termo “retém substancialmente” uma atividade pode referir-se a reter pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da atividade.

**DISPOSITIVOS DE PROCESSAMENTO LÓGICO, DISPOSITIVOS DE TRANSMISSÃO DE DADOS, DISPOSITIVOS DE RECEPÇÃO DE DADOS**

[0112] Um ou mais dos dispositivos de processamento lógico, dispositivos de transmissão de dados e dispositivos de recepção de dados podem ser implementados como, ou parte de, uma máquina de computação.

[0113] A máquina de computação pode ser um cliente, um servidor, um cliente e um servidor, um controlador lógico programável (“PLC”), ou qualquer outro dispositivo de processamento adequado. A máquina de computação pode incluir uma unidade de processamento central (“CPU”), memória e circuitos de entrada/saída (“I/O”), e/ou qualquer outro aparelho

adequado.

[0114] A CPU pode incluir um ou mais de um microprocessador, um microcomputador e um microcontrolador. Microprocessadores, microcomputadores e microcontroladores podem incluir componentes de circuitos digitais, tais como portas (*gates*) e *flip-flops*. A CPU pode ser construída utilizando um ou mais componentes de circuitos digitais discretos, como *flip-flops* e *gates*.

[0115] Microprocessadores, microcomputadores e microcontroladores podem estar na conformação de uma ou mais arquiteturas, tais como computador com um conjunto reduzido de instruções (RISC do acrônimo em inglês *Reduced Instruction Set Computer*) ou computador com um conjunto complexo de instruções (CISC - do acrônimo em inglês *Complex Instruction Set Computer*) ou de instrução de palavra muito grande (VLIW - do acrônimo em inglês *Very Long Instruction Word*) ou qualquer outra arquitetura adequada. As arquiteturas podem definir a configuração de um ou mais de um caminho de dados, circuitos de controle, circuitos de *clock*, circuitos de memória, e quaisquer outros caminhos ou configurações de circuitos adequados.

[0116] Os caminhos de dados podem ou não serem canalizados. Os caminhos de dados podem incluir uma unidade lógica aritmética ("ALU"). O circuito de controle pode interpretar instruções. O circuito de controle pode controlar os caminhos de dados. O circuito de *clock* pode regular a temporização de uma ou mais unidades de controle e caminhos de dados. O circuito de controle pode incluir uma ou mais máquinas de estados finitos, memória semente de leitura (ROM) e unidades de processamento interno em qualquer combinação adequada.

[0117] O circuito de memória pode fornecer valores de variáveis computacionais, como fatores de escalonamento. A memória pode fornecer

instruções, tais como as necessárias para calcular uma função objetiva. A memória pode incluir um ou mais registradores. A memória pode incluir um ou mais níveis de *cache*. A memória pode incluir componentes de endereçamento. Os componentes de endereçamento podem governar um sistema de memória virtual. Os componentes de endereçamento podem regular o acesso à memória externa e/ou aos dispositivos de memória.

[0118] O microprocessador pode estar integrado em uma pastilha de silício única em conjunto com registradores e alguns ou todos do *cache*. Um ou mais níveis de *cache* podem ser externos à pastilha de microprocessador.

[0119] A memória pode incluir uma ou mais memórias de acesso aleatório (“RAM”), memória somente de leitura (“ROM”), memória *Flash*, memória programável e apagável eletricamente (“EEPROM”), memória eletricamente programável (“EPROM”), disco magnético, fita magnética, memória de tambor (*drum*), discos óticos e qualquer outra memória adequada.

[0120] A memória pode ser dividida em componentes “*on board*” (por exemplo, memória de registro e memória designada como *cache*), o que pode ser incluído na pastilha de microprocessador e componentes de “memória externa”, que podem ser externas à pastilha de microprocessador. A memória externa pode ser parte da memória física endereçável (por exemplo, memória que pode ser designada como memória principal/ memória *core*) ou memória endereçável virtualmente. A memória de disco magnético pode ser usada para o armazenamento não volátil. A memória de disco magnético e pode ser parte de um sistema de memória virtual.

[0121] O circuito de entrada/saída (I/O) pode ser interno ou externo à pastilha de microprocessador. A conectividade de I/O pode envolver conexão direta com componentes de *hardware* (por exemplo, impressoras, elementos de controle de processo e outros componentes de *hardware* adequados). A conectividade de I/O pode envolver um ou mais componentes

de rede (como modems com fio, conectividade sem fio Wi-Fi, conexão de campo próximo e outros componentes de rede adequados) para comunicação com uma rede. A rede pode incluir nós na comunicação com fio. A rede pode incluir nós na comunicação sem fio. As redes podem incluir uma rede de área alargada (“WAN” - acrônimo de *wide area network*), uma rede de área local (“LAN” - acrônimo de *local area network*), uma rede Wi-Fi, ou qualquer outro tipo adequado de rede.

[0122] Para um tipo de conectividade I/O, a informação pode ser enviada usando um transmissor. Para um tipo de conectividade I/O, a informação pode ser recebida usando um receptor. Em alguns casos, o transmissor e receptor podem ser combinados em um transceptor. Tipicamente, a informação é informação digital organizada em pacotes. No entanto, a informação pode ser um único bit transmitido, tal como um que gira em torno de uma máquina ou indica um estado de um processo ou cálculo, um único bit recebido, tal como um que indica o estado de um sensor, um processo ou cálculo, ou pode incluir tensões ou correntes analógicas.

[0123] O transmissor pode incluir componentes de *hardware*. O transmissor pode incluir componentes de *software*. *Hardware*s podem ser incluídos para interagirem fisicamente com conectividade com fios ou mídia sem fio através do qual a energia de frequência de rádio propaga. O *hardware* transmissor pode incluir um transmissor de rádio. O transmissor pode ter apenas componentes de *hardware*. Porções do *hardware* podem ser externos para os microprocessadores, microcomputadores e microcontroladores. Por exemplo, uma saída de *bit* único pode utilizar um amplificador de deslocamento de nível para controlar uma máquina. Alguns protocolos transmissores podem ser atualizados por atualizações de *software*.

[0124] O receptor pode incluir componentes de *hardware*. O receptor pode incluir componentes de *software*. *Hardware*s podem ser incluídos

para interagirem fisicamente com conectividade com fios ou mídia sem fio através do qual a energia de frequência de rádio propaga. O *hardware* receptor pode incluir um receptor de rádio. O receptor pode ter apenas componentes de *hardware*. Porções do *hardware* podem ser externos para os microprocessadores, microcomputadores e microcontroladores. Por exemplo, uma saída de *bit* único pode utilizar um amplificador de deslocamento de nível para receber dados a partir de um sensor. Alguns protocolos receptores podem ser atualizados por atualizações de *software*.

[0125] A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para selecionar uma função objetiva correspondente a uma ou mais das características físico-químicas de um anticorpo.

[0126] A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para a identificação nos valores de memória (memória da máquina) legível por máquina dos fatores de escalonamento de função objetiva sob condições de solução de anticorpo. A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para recuperar os valores de fatores de escalonamento identificados.

[0127] A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para processar os parâmetros estruturais de anticorpo. O processamento pode ser processamento lógico. O processamento pode ser processamento numérico. O processamento pode incluir a avaliação dos parâmetros. O processamento pode produzir valores dos parâmetros. O processamento pode ser baseado nas características estruturais de anticorpo. O processamento pode ser baseado nas condições de solução.

[0128] A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para a avaliação da função objetiva. A avaliação pode ser baseada nos valores dos parâmetros e valores dos fatores de escalonamento. A avaliação da função objetiva pode produzir uma predição do valor de uma ou

mais características físico-químicas do anticorpo sob as condições da solução.

[0129] A máquina de computação pode ser configurada para incluir um meio para comparar a predição para um critério de design correspondente a uma ou mais características físico-químicas.

[0130] A máquina de computação pode ser configurada para incluir meios para selecionar o anticorpo em função da comparação. O anticorpo pode ser selecionado, se a predição está de acordo com o critério de design. O anticorpo pode ser selecionado para a produção de anticorpos.

#### **COMBINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS E PRINCÍPIOS DA INVENÇÃO**

[0131] Serão descritos agora métodos para a aplicação das características e princípios descritos acima para características físico-químicas exemplares. As características físico-químicas exemplares incluem viscosidade, depuração, labilidade do ácido aspártico e labilidade do triptofano.

[0132] Será compreendido que os métodos podem incluir a aplicação de princípios e características descritos acima para uma das características físico-químicas ou para uma combinação de duas ou mais características físico-químicas, em qualquer combinação entre elas.

[0133] Os métodos podem ser aplicados em qualquer combinação de características do aparelho, meios ou ambos.

#### **VISCOSIDADE**

[0134] A característica físico-química pode ser a viscosidade do anticorpo. O critério de design pode ser um limite de viscosidade. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a viscosidade do anticorpo é igual ao limite de viscosidade. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a viscosidade do anticorpo é menor do que o limite de viscosidade. O limite de viscosidade pode ser de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 ou 5 cP. São discutidos abaixo os métodos baseados na viscosidade de determinação da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico, seleção do anticorpo

a partir de vários anticorpos candidatos, fabricação do anticorpo, modificação do anticorpo pré-existente e produção do anticorpo-alvo. Será compreendido que uma ou mais etapas de um dos métodos pode ser realizada em combinação com uma ou mais etapas de outros métodos.

**VISCOSIDADE: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA APTIDÃO OU ADEQUAÇÃO DO ANTICORPO PARA INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0135] Os métodos podem incluir a determinação, com base na viscosidade, da aptidão do anticorpo para a inclusão no agente terapêutico. Os métodos podem compreender (a) o cálculo a partir da informação estrutural do anticorpo que pode compreender: (1) uma carga líquida; e (2) uma assimetria de carga; (b) a seleção do anticorpo: um primeiro fator de escalonamento (ou um fator de escalonamento de carga líquida), que corresponde à carga total, e um segundo fator de escalonamento (ou um fator de escalonamento de assimetria carga), que corresponde à assimetria de carga; (c) o cálculo de um índice a partir de uma função objetiva que compreende os fatores de escalonamento, em que o índice correspondente à viscosidade; (d) a comparação do índice com um critério de design; e (e) a determinação se o anticorpo possui a viscosidade que satisfaz o critério de design.

[0136] O cálculo a partir da informação estrutural pode compreender o cálculo da informação de uma estrutura primária. A estrutura primária pode compreender uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve (VL) e uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada (VH). Os métodos podem incluir o cálculo da carga líquida a partir da informação estrutural de um domínio variável. A carga líquida pode compreender uma soma de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VL e de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VH. Os métodos podem incluir o cálculo da assimetria de carga a partir de informações estruturais do domínio variável. A assimetria de carga pode

compreender um produto aritmético da carga líquida da sequência de aminoácidos VL e da carga líquida da sequência de aminoácidos VH. O método pode ainda compreender o cálculo (3) a partir de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade, uma hidrofobicidade.

[0137] O método pode compreender ainda a etapa de sequenciamento da sequência de aminoácidos do anticorpo. O método pode compreender ainda a etapa de produção do anticorpo.

[0138] Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de uma única região determinante de complementaridade do domínio variável. A região determinante de complementaridade única pode ser qualquer uma dentre CDR1, CDR2 e CDR3 do anticorpo. Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs). A uma ou mais regiões determinantes de complementaridade podem incluir duas, três, quatro, cinco ou seis regiões determinantes de complementaridade. A uma ou mais regiões determinantes de complementaridade podem incluir seis regiões determinantes de complementaridade. A hidrofobicidade pode ser calculada como uma soma dos valores de hidrofobicidade de umas ou mais regiões determinantes de complementaridade. A hidrofobicidade pode compreender um total de funções somatórias de valores de hidrofobicidade da uma ou mais CDRs. Cada função somatória pode ser uma razão de uma soma dos valores de resíduos hidrofóbicos de uma CDR pela soma dos valores de resíduos hidrofílicos da CDR. Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de um domínio Fv. Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de um domínio Fv quando o conjunto de treino de anticorpos inclui anticorpos de diferentes classes ou subclasses. O valor do resíduo hidrofóbico ou resíduo hidrofílico pode ser o

valor da escala de hidrofobicidade de Eisenberg para um dado resíduo de aminoácido.

[0139] A viscosidade pode ser medida experimentalmente utilizando um reômetro, incluindo, sem limitação, o tipo viscosímetro de con-placa e reômetro do tipo queda de esfera.

[0140] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica do índice. O índice pode ser quantificado a partir da função objetiva. A função objetiva pode incluir os fatores de escalonamento. O índice pode corresponder à viscosidade.

[0141] Os métodos podem incluir a comparação do índice para o limite de viscosidade do critério de design para determinar se o anticorpo tem a viscosidade que satisfaz o limite de viscosidade do critério de design.

[0142] Na função objetiva,  $\log_{10}$  do índice pode depender da soma:

(a carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga X o segundo fator de escalonamento) mais (a hidrofobicidade X o terceiro fator de escalonamento).

[0143] A função objetiva pode ter a forma geral de índice =  $10^{\text{constante} + 10^{\text{soma}}}$ .

[0144] Os métodos podem incluir a seleção de fatores de escalonamento. Os fatores de escalonamento podem incluir um primeiro fator de escalonamento (ou um fator de escalonamento de carga líquida). O primeiro fator de escalonamento pode corresponder à carga líquida. Os fatores de escalonamento podem incluir um segundo fator de escalonamento (ou um fator de escalonamento de assimetria de carga). O segundo fator de escalonamento pode corresponder à assimetria de carga. Os fatores de escalonamento podem incluir um terceiro fator de escalonamento (ou um fator de escalonamento de hidrofobicidade). O terceiro fator de escalonamento pode corresponder à

hidrofobicidade. Os fatores de escalonamento podem ser selecionados a partir do conjunto de fatores que podem incluir uma pluralidade de primeiros fatores de escalonamento, uma pluralidade de segundos fatores de escalonamento e uma pluralidade de terceiros fatores de escalonamento. Os métodos podem compreender ainda a derivação dos fatores de escalonamento a partir de dados de pelo menos uma medição de viscosidade de pelo menos um anticorpo teste, em que o anticorpo e o anticorpo teste são da mesma classe de anticorpo. Os fatores de escalonamento podem ser fatores de escalonamento derivados.

[0145] As condições de solução podem incluir a força iônica. Para soluções de baixa força iônica, o terceiro fator de escalonamento pode ser zero. Um exemplo de uma solução de baixa força iônica pode ser uma solução tampão com concentração de 20-30 milimolar.

[0146] Para soluções de baixa força iônica, os métodos podem não incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural do anticorpo e nem a soma nem os fatores de escalonamento podem incluir o terceiro fator de escalonamento. Para soluções de baixa força iônica, os métodos podem não incluir a seleção do terceiro fator de escalonamento. Na função objetiva para soluções de baixa força iônica,  $\log_{10}$  do índice pode depender da soma:

(a carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga X o segundo fator de escalonamento).

[0147] Para soluções de força iônica elevada, a estreita correspondência do índice com a característica físico-química pode ser conseguida pela inclusão de uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs no cálculo da hidrofobicidade. Um exemplo de uma solução de alta força iônica pode ser um tampão iônico com concentração de cerca de 200 milimolar.

[0148] Por exemplo, para uma IgG<sub>1</sub> monoclonal em uma solução

tampão de aproximadamente 200 milimolar a cerca de 25°C e cerca de pH 5,5, o primeiro, segundo e terceiro fator de escalonamento podem rastrear com a concentração do anticorpo da seguinte forma:

para uma concentração de anticorpo de cerca de 150 miligramas por mililitro, o primeiro fator de escalonamento pode ser de cerca de -0,036, o segundo fator de escalonamento pode ser de cerca de -0,012 e o terceiro fator de escalonamento pode ser de cerca de 0,34; e para uma concentração de anticorpo de cerca de 180 miligramas por mililitro, o primeiro fator de escalonamento pode ser de cerca de -0,05, o segundo fator de escalonamento pode ser de cerca de -0,017 e o terceiro fator de escalonamento pode ser de cerca de 0,42.

[0149] O termo “cerca de” um determinado valor ou intervalo pode referir-se a suficiência de proximidade ao valor ou intervalo para obter um resultado substancialmente similar ao obtida com o valor, ou dentro do intervalo. Um resultado “substancialmente semelhante” pode estar dentro de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10% de um resultado obtido com o valor, ou dentro do intervalo.

[0150] Para este exemplo alta força iônica, a quantificação do índice para cada uma das concentrações de anticorpo exemplificativas pode produzir um índice que corresponde a viscosidade medida, tal como a medida em centipoise. Para algumas classes e subclasses de anticorpo, o método pode incluir o cálculo a partir da informação estrutural da região constante do anticorpo, uma assimetria de carga da região constante. Por estas classes e subclasses, o conjunto de fatores de escalonamento pode incluir uma pluralidade de fatores de escalonamento de assimetria de carga da região constante e os métodos podem incluir a seleção de um fator de escalonamento da assimetria de carga da região constante do anticorpo (ou quarto fator de escalonamento) que pode corresponder à assimetria de carga da região

constante. Para estas classes e subclasses, a função objetiva pode incluir o fator de escalonamento da assimetria de carga da região constante. A classe (ou subclasse) do anticorpo pode ser IgG<sub>4</sub>.

[0151] Para estas classes e subclasses, o  $\log_{10}$  do índice pode depender da soma:

(a carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga do domínio variável X o segundo fator de escalonamento) mais (a hidrofobicidade X o terceiro fator de escalonamento), e

dependendo da classe (ou subclasse), a assimetria de carga da região constante X o fator de escalonamento assimetria de carga da região constante).

[0152] Para estas classes e subclasses, para soluções de baixa força iônica, o terceiro fator de escalonamento pode ser zero. Para soluções de baixa força iônica, os métodos podem não incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural do anticorpo e nem a soma nem os fatores de escalonamento podem incluir o terceiro fator de escalonamento. Para soluções de baixa força iônica, os métodos podem não incluir a seleção do terceiro fator de escalonamento. Na função objetiva para soluções de baixa força iônica,  $\log_{10}$  do índice pode depender da soma:

(a carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga do domínio variável X o segundo fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga da região constante X fator de escalonamento da assimetria de carga da região constante).

[0153] As classes e subclasses para as quais os métodos podem calcular e utilizar uma assimetria carga da região constante, e podem selecionar e utilizar um fator de escalonamento da assimetria de carga da região constante correspondente, podem incluir a IgG<sub>4</sub>.

**VISCOSIDADE: MÉTODOS DE SELEÇÃO ENTRE ANTICORPOS CANDIDATOS PARA A  
INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO.**

[0154] Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo com base na viscosidade, a partir de dois ou mais anticorpos candidatos e pode incluir nenhuma, algumas ou todas as etapas dos métodos para a determinação da aptidão de viscosidade.

[0155] Os métodos podem incluir o fornecimento da primeira informação estrutural de um primeiro anticorpo candidato. A primeira informação estrutural pode incluir uma primeira sequência de aminoácidos do primeiro anticorpo candidato. Os métodos podem incluir o fornecimento de uma segunda informação estrutural de um segundo anticorpo candidato. A segunda informação estrutural pode incluir uma segunda sequência de aminoácidos do segundo anticorpo candidato.

[0156] Os métodos podem incluir o cálculo numérico a partir da primeira informação estrutural de um primeiro conjunto de parâmetros estruturais: (1) uma primeira carga líquida; (2) uma primeira assimetria de carga; e (3) uma primeira hidrofobicidade. Os métodos podem incluir o cálculo numérico a partir da segunda informação estrutural de um segundo conjunto de parâmetros estruturais: (1) uma segunda carga líquida; (2) uma segunda assimetria de carga; e, (3) uma segunda hidrofobicidade.

[0157] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um primeiro índice a partir de uma primeira função objetiva. A primeira função objetiva pode incluir um primeiro conjunto de fatores de escalonamento correspondentes para o primeiro conjunto de parâmetros físico-químicos. O primeiro índice pode corresponder ao primeiro anticorpo candidato. O primeiro índice pode corresponder a uma primeira viscosidade do primeiro anticorpo candidato. Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um segundo índice a partir de uma segunda função objetiva. A segunda função objetiva

pode incluir um segundo conjunto de fatores de escalonamento correspondentes ao segundo conjunto de parâmetros estruturais. O segundo índice pode corresponder ao segundo anticorpo candidato. O segundo índice pode corresponder a uma segunda viscosidade do segundo anticorpo candidato. O primeiro e o segundo conjunto de fatores de escalonamento e as funções objetivas podem ser as mesmas. O primeiro e o segundo conjunto de fatores de escalonamento e funções objetivas podem ser diferentes.

[0158] Cada conjunto de fatores de escalonamento pode incluir um fator de escalonamento de carga líquida correspondente a carga líquida, um fator de escalonamento de assimetria de carga correspondente a assimetria de carga e um fator de escalonamento de hidrofobicidade correspondente a hidrofobicidade. Para algumas classes e subclasses de anticorpos candidatos, os fatores de escalonamento de assimetria de carga do primeiro conjunto e/ou o segundo conjunto de fatores de escalonamento podem ser fatores de escalonamento de assimetria de carga do domínio variável.

[0159] Para determinadas classes e subclasses de anticorpos candidatos, os métodos podem incluir o cálculo, a partir da informação estrutural da região constante do primeiro anticorpo candidato e/ou do segundo anticorpo candidato, uma primeira assimetria de carga da região constante para o primeiro conjunto de parâmetros estruturais e/ou uma segunda assimetria de carga da região constante para o segundo conjunto de parâmetros estruturais, respectivamente. Um exemplo de classe e subclasse pode ser a IgG<sub>4</sub>.

[0160] A primeira função objetiva e a segunda função objetiva podem incluir os fatores de escalonamento para o primeiro anticorpo candidato e o segundo anticorpo candidato, respectivamente. Para anticorpos candidatos em soluções de baixa força iônica, os fatores de escalonamento de hidrofobicidade podem ser zero. Para anticorpos candidatos em soluções de

baixa força iônica, os métodos podem não incluir o cálculo de hidrofobicidade. Para anticorpos candidatos em soluções de baixa força iônica, as funções objetivas não podem incluir fatores de escalonamento de hidrofobicidade.

[0161] Se a classe ou subclasse do primeiro anticorpo candidato é a classe ou subclasse do segundo anticorpo candidato, o primeiro conjunto de fatores de escalonamento pode ser idêntico ao segundo conjunto de fatores de escalonamento. Se as condições da solução do primeiro anticorpo candidato são as condições de soluções do segundo anticorpo candidato, o primeiro conjunto de fatores de escalonamento pode ser idêntico ao segundo conjunto de fatores de escalonamento.

[0162] O primeiro índice pode satisfazer o limite de viscosidade do critério de design. O segundo índice pode satisfazer o limite de viscosidade do critério de design.

[0163] Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato ou segundo anticorpo candidato para ser o anticorpo para uso no agente terapêutico com base no valor relativo do primeiro índice e segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato se o primeiro índice é menor do que o segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do segundo anticorpo candidato se o segundo índice é menor do que o primeiro índice. Os métodos podem compreender ainda a etapa de comparar o primeiro e o segundo índice com um critério de design. O anticorpo selecionado pode ter uma viscosidade que satisfaz o critério de design.

#### **VISCOSIDADE: MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0164] Os métodos de fabricação podem incluir o estabelecimento de um limite de viscosidade para o anticorpo com base no recipiente de fabricação ou de distribuição terapêutica. Os métodos de fabricação do agente terapêutico podem incluir nenhum, alguns ou todas as etapas dos métodos para a determinação da aptidão de viscosidade.

[0165] Os métodos de fabricação podem incluir a identificação de um elemento de condução fluída no recipiente de fabricação ou recipiente de distribuição. O elemento de condução de fluido pode incluir um tubo, uma válvula, um *plug* poroso ou qualquer outro elemento de condução de fluido. Qualquer outro elemento de condução de fluido pode incluir um tubo, um meio cromatográfico ou um filtro. O elemento de condução de fluido pode ter uma resistência ao fluxo de fluido. A resistência ao fluxo de fluido pode depender da viscosidade do anticorpo sob o conjunto de condições de solução aquosa de fabricação e/ou de distribuição.

[0166] Os métodos de fabricação podem incluir a quantificação por via eletrônica, a partir da informação estrutural do anticorpo, com o índice correspondendo à viscosidade do anticorpo. A quantificação pode seguir os métodos para a determinação da aptidão de viscosidade do anticorpo.

[0167] Os métodos podem incluir a transmissão do anticorpo através do elemento de condução de fluido apenas se o índice não ultrapassa o limite. Os métodos podem incluir a fabricação do anticorpo apenas se o índice não ultrapassa o limite.

[0168] Os métodos podem incluir a construção do anticorpo-alvo de tal modo que a viscosidade do agente terapêutico não exceda o limite de viscosidade.

[0169] Os métodos podem incluir a determinação de uma sequência de aminoácidos para o anticorpo-alvo. A sequência de aminoácidos pode corresponder a um índice de viscosidade que é inferior ao limite de viscosidade.

[0170] A determinação da sequência de aminoácidos pode incluir a quantificação de maneira eletrônica da viscosidade teste a partir de uma sequência de aminoácidos do anticorpo teste do anticorpo pré-existente. A quantificação pode incluir nenhuma, algumas ou todas as etapas para a

determinação da aptidão de viscosidade do anticorpo.

[0171] A invenção também provê métodos para a fabricação de uma composição compreendendo um anticorpo, em que os métodos podem incluir o estabelecimento de um limite de viscosidade para o anticorpo com base em uma resistência ao fluxo de fluido de um elemento de condução de fluido em um recipiente de fabricação, a resistência ao fluxo de fluido dependendo da viscosidade de fluido que flui através do elemento; transmissão da informação estrutural do anticorpo através de uma rede; recepção através da rede de um índice de viscosidade de um anticorpo calculado a partir da informação estrutural; e apenas se o índice não excede o limite de viscosidade, a transmissão do anticorpo através do elemento para a fabricação da composição.

[0172] O método pode incluir o estabelecimento de um limite de viscosidade para o anticorpo com base em uma resistência ao fluxo de fluido de um elemento de condução de fluido em um recipiente de fabricação, em que a resistência ao fluxo de fluido depende da viscosidade do fluido que flui através do elemento; fazendo o cálculo do índice de viscosidade de um anticorpo a partir de informações estruturais do anticorpo; e apenas se o índice não excede o limite de viscosidade, é feita a transmissão do anticorpo através do elemento para a fabricação da composição.

#### **VISCOSIDADE: MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO**

[0173] Os métodos de produção de um anticorpo que tem uma viscosidade que satisfaz um critério de design podem compreender as etapas de (a) estabelecimento de um limite de viscosidade para o anticorpo; (b) cálculo, a partir de informações estruturais do anticorpo de acordo com os métodos descritos ao longo do pedido, de um índice de viscosidade que corresponde à viscosidade do anticorpo; e a etapa de determinar se o anticorpo possui uma viscosidade que satisfaz o critério de design; e (c) se o índice não

excede o limite de viscosidade, a produção do anticorpo.

[0174] Os métodos de produção de um anticorpo que tem uma viscosidade que satisfaz um critério de design podem incluir as etapas de estabelecimento de um limite de viscosidade para o anticorpo, limite de viscosidade que satisfaz o critério de design; transmitir a informação estrutural do anticorpo através de uma rede; receber através da rede um índice que corresponde à viscosidade do anticorpo, o índice calculado a partir da informação estrutural; determinar se o anticorpo tem uma viscosidade que satisfaz o critério de design; e apenas se o índice não excede o limite de viscosidade, a produção do anticorpo.

[0175] Para cada exemplo de realização descrita na presente invenção, o índice é calculado pelo método compreendendo as etapas de: cálculo a partir da informação estrutural do anticorpo: uma carga líquida e uma assimetria de carga; seleção para o anticorpo: um primeiro fator de escalonamento que corresponde à carga líquida, e um segundo fator de escalonamento que corresponde à assimetria de carga; e o cálculo do índice a partir de uma função objetiva que compreende os fatores de escalonamento, em que o índice correspondente à viscosidade. O cálculo a partir da informação estrutural pode compreender o cálculo da informação de uma estrutura primária. A estrutura primária pode compreender uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve (VL) e uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada (VH). A carga líquida pode compreender uma soma de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VL e de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VH. A assimetria de carga pode compreender um produto aritmético da carga líquida da sequência de aminoácidos VL e da carga líquida da sequência de aminoácidos VH. O método pode compreender ainda a derivação dos fatores de escalonamento a partir de dados de pelo menos uma medição de viscosidade

de pelo menos um anticorpo teste, em que o anticorpo e o anticorpo teste são da mesma classe de anticorpo. A seleção dos fatores de escalonamento pode compreender a seleção do primeiro fator de escalonamento e do segundo fator de escalonamento a partir de um conjunto de fatores de escalonamento para cada uma dentre a uma ou mais condições de solução aquosa. A função objetiva,  $\log_{10}$  do índice pode compreender a soma (da carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga X o segundo fator de escalonamento).

[0176] Para cada exemplo de realização descrito na presente invenção, os métodos podem compreender ainda o cálculo a partir da informação estrutural, a partir de informações de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo, uma hidrofobicidade; e a seleção de um terceiro fator de escalonamento que corresponde à hidrofobicidade, em que a função objetiva compreende ainda o terceiro fator de escalonamento. A hidrofobicidade pode compreender um total de funções somatórias de valores de hidrofobicidade da uma ou mais CDRs. Cada função somatória pode ser uma razão entre a soma de valores de resíduos hidrofóbicos de uma CDR e a soma dos valores de resíduos hidrofílicos da CDR. Os valores podem ser valores da escala de hidrofobicidade de Eisenberg. A uma ou mais CDRs pode compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou todas as seis CDRs. A seleção dos fatores de escalonamento pode compreender ainda a seleção do primeiro fator de escalonamento, do segundo fator de escalonamento e do terceiro fator de escalonamento a partir de um conjunto de fatores de escalonamento para cada uma ou mais condições de solução aquosa. A função objetiva,  $\log_{10}$  do índice pode compreender a soma (da carga líquida X o primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga X o segundo fator de escalonamento) mais (a hidrofobicidade X o terceiro fator de escalonamento).

[0177] Para cada exemplo de realização descrito na presente invenção, os métodos podem compreender ainda a etapa de mutagenização de um ou mais resíduos de aminoácido da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo para gerar um anticorpo alvo quando o índice excede o limite de viscosidade. A etapa de mutagenização da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve e/ou cadeia pesada pode reduzir a hidrofobicidade, aumentar a carga líquida, e/ou aumentar ou diminuir a assimetria de carga de modo que o índice do anticorpo alvo não exceda o limite de viscosidade. O método pode compreender ainda a etapa de produção do anticorpo alvo.

[0178] Em exemplos de realização adicionais, a invenção provê anticorpos selecionados, produzidos e/ou determinados para satisfazer o critério de design de viscosidade pelos métodos e aparelhos descritos na presente invenção.

#### **DEPURAÇÃO**

[0179] A característica físico-química pode ser a depuração farmacocinética do anticorpo. O critério de design pode ser um limite da taxa de depuração farmacocinética. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a taxa de depuração do anticorpo é igual a taxa de depuração limite. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a taxa de depuração do anticorpo é menor que a taxa de depuração limite. O limite da taxa de depuração pode ser de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 ou 5 mL/kg/dia. O limite da taxa de depuração pode ser de 10 mL/kg/dia em macacos *Cyno*.

[0180] São discutidos abaixo os métodos baseados na taxa de depuração para determinação da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico, seleção do anticorpo a partir de vários anticorpos candidatos, fabricação do anticorpo, modificação do anticorpo pré-existente e produção do

anticorpo-alvo. Será compreendido que uma ou mais etapas a partir de um dos métodos pode(m) ser realizada(s) em combinação com uma ou mais etapas dos outros métodos.

**DEPURAÇÃO: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA APTIDÃO OU ADEQUAÇÃO DO ANTICORPO PARA INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0181] Os métodos podem incluir a determinação, com base na depuração, da aptidão do anticorpo para a inclusão no agente terapêutico. Os métodos podem incluir o cálculo da carga líquida a partir da informação estrutural do anticorpo. O intervalo de carga líquida pode depender das condições de solução aquosa. A carga líquida pode estar em conformidade com um intervalo de carga líquida. O intervalo de carga líquida pode ser de -4 a 12. O intervalo de carga líquida pode ser -2 a 6,2. O intervalo de carga líquida pode ser 0 a 6,2. O intervalo de carga líquida pode variar dependendo das condições da solução e do tamanho da amostra do conjunto de treino de anticorpos.

[0182] Os métodos podem incluir, (a) se a carga líquida pode estar em conformidade com o intervalo de carga líquida, o cálculo de uma hidrofobicidade a partir da informação estrutural de uma ou mais CDRs e (i) a determinação de que o anticorpo tem uma taxa de depuração que satisfaz o critério de design quando a hidrofobicidade não excede um limite de hidrofobicidade ou (ii) a determinação de que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design quando a hidrofobicidade é maior do que o limite de hidrofobicidade; e (b) se a carga líquida não está de acordo com o intervalo de carga líquida, é feita a determinação de que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design. A informação estrutural pode ser a informação de uma estrutura primária. A estrutura primária pode compreender uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve (VL) e uma sequência de aminoácidos do

domínio variável de cadeia pesada (VH). A carga líquida pode ser a carga líquida de VH e VL em pH 5,5. O intervalo de carga líquida pode ser de aproximadamente -4 a aproximadamente 6,2. O limite de hidrofobicidade pode ser de aproximadamente 4.

[0183] Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de uma única região determinante de complementaridade do domínio variável. Os métodos podem incluir o cálculo da hidrofobicidade a partir da informação estrutural de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade conforme descrito no presente. A pluralidade de regiões determinantes de complementaridade pode incluir duas, três, quatro, cinco ou seis regiões determinantes de complementaridade. A hidrofobicidade pode ser calculada como uma soma dos valores de hidrofobicidade de umas ou mais regiões determinantes de complementaridade. A uma ou mais CDRs pode ser CDR1 de cadeia leve (LC), CDR3 LC e CDR3 de cadeia pesada (HC). O método pode compreender adicionalmente a etapa de produção do anticorpo.

[0184] A seção e Resultados Ilustrativos e as Figuras divulgam a correspondência do índice à taxa de depuração.

**DEPURAÇÃO: MÉTODOS DE SELEÇÃO ENTRE ANTICORPOS CANDIDATOS PARA A  
INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO.**

[0185] Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo com base na taxa de depuração, a partir de dois ou mais anticorpos candidatos e pode incluir uma ou mais etapas dos métodos para a determinação da aptidão da depuração.

[0186] Por exemplo, o anticorpo pode ser selecionado a partir de dois anticorpos candidatos para inclusão no agente terapêutico. Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento da primeira informação estrutural de um primeiro anticorpo candidato. A primeira informação estrutural pode incluir uma

primeira sequência de aminoácidos do primeiro anticorpo candidato. Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento de uma segunda informação estrutural de um segundo anticorpo candidato. A segunda informação estrutural pode incluir uma segunda sequência de aminoácidos do segundo anticorpo candidato.

[0187] Os métodos podem incluir o cálculo a partir da primeira informação estrutural de uma primeira carga líquida e, a partir de uma ou mais CDRs do primeiro anticorpo candidato, uma primeira hidrofobicidade. Os métodos podem incluir o cálculo a partir da segunda informação estrutural de uma segunda carga líquida e, a partir de uma ou mais CDRs do segundo anticorpo candidato, uma segunda hidrofobicidade.

[0188] O primeiro intervalo de carga líquida e o segundo intervalo de carga líquida podem depender das condições de solução aquosa. O primeiro intervalo de carga líquida e o segundo intervalo de carga líquida podem depender da classe ou subclasse do primeiro anticorpo candidato e a classe ou subclasse do segundo anticorpo candidato, respectivamente. O primeiro e segundo intervalo de carga líquida podem ser o mesmo. O primeiro e segundo intervalo de carga líquida podem ser diferentes.

[0189] Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato ou segundo anticorpo candidato para ser o anticorpo para uso no agente terapêutico com base no valor relativo do primeiro índice e segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo candidato que tem uma hidrofobicidade inferior a outro anticorpo candidato ou anticorpos candidatos. Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo candidato que tem uma taxa de depuração que satisfaz o critério de design.

#### **DEPURAÇÃO: MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0190] Os métodos de fabricação podem incluir o estabelecimento de um limite de taxa de depuração para o anticorpo com base em uma dose de

manutenção. Os métodos de fabricação do agente terapêutico podem incluir uma ou mais etapas dos métodos para a determinação da aptidão da taxa de depuração.

[0191] Os métodos de fabricação podem incluir a identificação da dose de manutenção para o agente terapêutico. A dose de manutenção pode depender da taxa de depuração farmacocinética do anticorpo. A taxa de depuração pode ser uma taxa de depuração do anticorpo sob um conjunto de condições fisiológicas. As condições fisiológicas podem ser encontradas no uso terapêutico do anticorpo.

[0192] Os métodos podem incluir a fabricação ou produção do anticorpo apenas se o anticorpo possui uma taxa de depuração que não exceda o limite. O método pode compreender transmissão da informação estrutural do anticorpo através de uma rede; recepção através da rede de uma carga líquida do anticorpo, sendo a carga líquida calculada a partir da informação estrutural; se a carga líquida está de acordo com um intervalo de carga líquida, é feita a recepção através da rede da hidrofobicidade calculada a partir da informação estrutural, a partir de informações de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo, e (i) se a hidrofobicidade não excede um limite de hidrofobicidade, isso determina que o anticorpo tem uma taxa de depuração que satisfaz o critério de design; ou (ii) se a hidrofobicidade excede o limite de hidrofobicidade, isso determina que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design; se a carga líquida não está de acordo com o intervalo de carga líquida, é feita a determinação de que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design; e somente se o anticorpo é determinado como tendo a taxa de depuração que satisfaz o critério de design, é feita a produção do anticorpo.

[0193] A invenção também provê métodos de produção de um anticorpo que tem uma taxa de depuração que satisfaz um critério de design,

cujo método compreende: o cálculo de uma carga líquida do anticorpo a partir da informação estrutural do anticorpo; se a carga líquida está de acordo com um intervalo de carga líquida, é feito o cálculo de hidrofobicidade a partir da informação estrutural, a partir de informações de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo, e (i) se a hidrofobicidade não excede um limite de hidrofobicidade, isto determina que o anticorpo tem uma taxa de depuração que satisfaz o critério de design ou (ii) se a hidrofobicidade excede o limite de hidrofobicidade, isto determina que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design; se a carga líquida não está de acordo com o intervalo de carga líquida, é determinado que o anticorpo tem uma taxa de depuração que não satisfaz o critério de design; e apenas se o anticorpo é determinado como possuindo uma taxa de depuração que satisfaz o critério de design, o anticorpo é produzido.

[0194] Para cada exemplo de realização descrito no presente, o cálculo a partir da informação estrutural pode compreender o cálculo a partir da informação de uma estrutura primária. A estrutura primária pode compreender uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve (VL) e uma sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada (VH). A carga líquida pode compreender uma soma de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VL e de uma carga líquida da sequência de aminoácidos de VH. A carga líquida pode compreender a soma da carga líquida de VH e da carga líquida de VL, a cerca de pH 5,5. A hidrofobicidade pode compreender um total de funções somatórias de valores de hidrofobicidade da uma ou mais CDRs. As funções somatórias podem ser uma razão entre a soma de valores de resíduos hidrofóbicos de uma CDR e a soma dos valores de resíduos hidrofílicos da CDR. Os valores podem ser valores da escala de hidrofobicidade de Eisenberg. A uma ou mais CDRs pode compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou todas as seis CDRs. A uma ou mais CDRs pode

ser CDR1 de cadeia leve (LC), CDR3 LC e CDR3 de cadeia pesada (HC). A taxa de depuração pode ser maior do que cerca de 10 mL/kg/dia mensurado em um modelo de macaco cinomolgo. O intervalo de carga líquida pode ser de aproximadamente -4 a aproximadamente 6,2. O limite de hidrofobicidade pode ser de aproximadamente 4.

[0195] Os métodos de mutagênese podem incluir um ou mais resíduos de aminoácido de um anticorpo pré-existente para gerar um anticorpo-alvo de tal modo que a taxa de depuração do anticorpo alvo não exceda o limite da taxa de depuração. Os métodos podem compreender ainda as etapas de aumentar ou diminuir a carga líquida de modo que a carga líquida do anticorpo alvo está de acordo com o intervalo de carga líquida e/ou aumentando ou diminuindo a hidrofobicidade de modo a que a hidrofobicidade do anticorpo alvo não exceda o limite de hidrofobicidade.

[0196] Os métodos podem incluir a determinação de uma sequência de aminoácidos para o anticorpo-alvo. Os métodos podem compreender ainda a etapa de produção do anticorpo alvo.

[0197] Em exemplos de realização adicionais, a invenção provê anticorpos selecionados, produzidos e/ou determinados para satisfazer o critério de design de depuração pelos métodos e aparelhos descritos na presente invenção.

#### **LABILIDADE DO ÁCIDO ASPÁRTICO**

[0198] A característica físico-química pode ser a labilidade do ácido aspártico (Asp) do anticorpo. A labilidade do Asp pode corresponder a uma isomerização do resíduo Asp. O resíduo Asp pode estar em uma CDR do anticorpo. O critério de design pode ser um limite de labilidade do Asp. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a labilidade do Asp do anticorpo é igual ao limite de labilidade do Asp. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a labilidade do Asp do anticorpo é menor do que o

limite de labilidade do Asp. O limite de labilidade do Asp pode ser de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% ou menos. O limite de labilidade do Asp pode ser de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% ou menos ao longo de duas semanas a 40 °C. O limite de labilidade do Asp pode ser de 5% ou menos ao longo de duas semanas a 40 °C.

[0199] São discutidos abaixo os métodos baseados na labilidade do Asp para determinação da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico, seleção do anticorpo a partir de vários anticorpos candidatos, fabricação do anticorpo, modificação do anticorpo pré-existente e produção do anticorpo-alvo. Será compreendido que uma ou mais etapas a partir de um dos métodos pode(m) ser realizada(s) em combinação com uma ou mais etapas dos outros métodos.

**LABILIDADE DO ASP MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA APTIDÃO DO ANTICORPO  
PARA INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0200] Os métodos podem incluir a determinação, com base na labilidade do Asp, da aptidão do anticorpo para a inclusão no agente terapêutico. Os métodos podem incluir (a) o cálculo a partir da informação estrutural do anticorpo: (1) uma flutuação do  $\alpha$ -carbono do Asp, (2) uma média temporal SASA do resíduo Asp e (3) uma média temporal SASA de um átomo de nitrogênio da cadeia principal associado com um resíduo imediatamente adjacente ao resíduo Asp. O átomo de nitrogênio de cadeia principal pode estar associado com um resíduo imediatamente adjacente na sequência ao resíduo Asp; (b) a seleção para o anticorpo de (i) uma flutuação do fator de escalonamento, (ii) um fator de escalonamento da área de superfície do resíduo de ácido aspártico, e (iii) um fator de escalonamento da área de superfície do átomo de nitrogênio da cadeia principal; (c) o cálculo de um índice a partir de uma função objetiva que compreende os fatores de escalonamento, em que o índice correspondente à labilidade do ácido aspártico; e (d) a etapa

de determinar se o anticorpo possui a labilidade do ácido aspártico que satisfaz o critério de design. O cálculo pode usar simulações de MD. As simulações de MD podem empregar o conjunto de condições de solução simuladas e podem empregar a solvatação em água explícita.

[0201] O resíduo Asp pode estar em uma CDR. O resíduo de aminoácido imediatamente adjacente ao resíduo de ácido aspártico está na posição N+1 em relação ao resíduo de ácido aspártico na posição N.

[0202] Os métodos podem incluir a seleção de fatores de escalonamento. Os fatores de escalonamento podem ser fatores de escalonamento derivados. Os fatores de escalonamento podem incluir um fator de escalonamento de flutuação correspondente à flutuação de  $\alpha$ -carbono do Asp. Os fatores de escalonamento podem incluir um fator de escalonamento de SASA Asp correspondente à SASA Asp. Os fatores de escalonamento podem incluir um fator de escalonamento de SASA do átomo de nitrogênio de cadeia principal correspondente ao SASA do átomo de nitrogênio de cadeia principal. Os fatores de escalonamento podem ser selecionados a partir do conjunto de fatores que podem incluir uma pluralidade de fatores de escalonamento de flutuação, uma pluralidade de segundos fatores de escalonamento de SASA Asp e uma pluralidade de terceiros fatores de escalonamento de SASA Asp.

[0203] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica do índice. O índice pode ser quantificado a partir da função objetiva. A função objetiva pode incluir os fatores de escalonamento. O índice pode corresponder à labilidade de Asp.

[0204] Os métodos podem incluir a comparação do índice para o limite de labilidade de Asp do critério de design para determinar se o anticorpo tem a labilidade de Asp que satisfaz o limite de labilidade de Asp do critério de design.

[0205] Na função objetiva, o índice pode depender do número de

Euler (a base e) elevado à soma:

(a flutuação de  $\alpha$ -carbono de Asp X o fator de escalonamento de flutuação) mais (a média temporal de SASA Asp X o fator de escalonamento SASA Asp) mais (a média temporal SASA acessível ao solvente do átomo de nitrogênio da cadeia principal X o fator de escalonamento da SASA do átomo de nitrogênio da cadeia principal). A função objetiva pode ter a forma geral de índice =  $e^{\text{constante}e^{\text{soma}}}$ . A função objetiva pode ter a forma geral de índice =  $1/(e^{\text{constante}e^{\text{soma}}})$ . A função objetiva pode ter a forma geral de índice =  $1/(1+e^{\text{constante}e^{\text{soma}}})$ .

[0206] Por exemplo, para uma IgG<sub>1</sub> monoclonal a uma temperatura simulada de cerca de 300 K com solvatação em água explícita e outras condições de solução simuladas tal como descrito na seção Métodos Exemplares, o fator de escalonamento de flutuação pode ser de cerca de 3,3; o fator de escalonamento SASA Asp pode ser de cerca de -22,2; e o fator de escalonamento SASA átomo de nitrogênio da cadeia principal pode ser de cerca de 16,0.

[0207] Os métodos podem incluir o índice sendo um primeiro índice e o primeiro índice sendo arredondado para um algarismo significativo para a produção de um segundo índice. O segundo índice pode ser 1 ou zero. O segundo índice sendo zero pode corresponder a uma indicação de que o primeiro índice satisfaz o limite de labilidade do critério de design.

**LABILIDADE DO ASP MÉTODOS DE SELEÇÃO ENTRE ANTICORPOS CANDIDATOS PARA A INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO.**

[0208] Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo com base na taxa de depuração, a partir de dois ou mais anticorpos candidatos e pode incluir uma ou mais etapas dos métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Asp.

[0209] Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento da

primeira informação estrutural de um primeiro anticorpo candidato. A primeira informação estrutural pode incluir uma primeira sequência de aminoácidos de domínio variável do primeiro anticorpo candidato. Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento de uma segunda informação estrutural de um segundo anticorpo candidato. A segunda informação estrutural pode incluir uma segunda sequência de aminoácidos de domínio variável do segundo anticorpo candidato.

[0210] Os métodos podem incluir o cálculo numérico a partir da primeira informação estrutural de um primeiro conjunto de parâmetros físico-químicos incluindo: (1) uma primeira flutuação do  $\alpha$ -carbono do Asp do primeiro anticorpo candidato, (2) uma média temporal SASA do primeiro resíduo Asp e (3) uma média temporal SASA de um primeiro átomo de nitrogênio da cadeia principal associado com um resíduo imediatamente adjacente ao primeiro resíduo Asp. O primeiro resíduo Asp pode estar em uma CDR do primeiro anticorpo candidato. O primeiro átomo de nitrogênio de cadeia principal pode estar associado com um resíduo imediatamente adjacente na sequência com o primeiro resíduo Asp.

[0211] Os métodos podem incluir o cálculo numérico a partir da segunda informação estrutural de um segundo conjunto de parâmetros físico-químicos incluindo: (1) uma segunda flutuação do  $\alpha$ -carbono do Asp do segundo anticorpo candidato, (2) uma média temporal SASA do segundo resíduo Asp e (3) uma média temporal SASA de um segundo átomo de nitrogênio da cadeia principal associado com um resíduo imediatamente adjacente ao segundo resíduo Asp. O segundo resíduo Asp pode estar em uma CDR do segundo anticorpo candidato. O segundo átomo de nitrogênio de cadeia principal pode estar associado com um resíduo imediatamente adjacente na sequência com o segundo resíduo Asp.

[0212] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um

primeiro índice a partir de uma primeira função objetiva. A primeira função objetiva pode incluir um primeiro conjunto de fatores de escalonamento correspondentes para o primeiro conjunto de parâmetros físico-químicos. O primeiro índice pode corresponder ao primeiro anticorpo candidato. O primeiro índice pode corresponder a uma primeira labilidade do Asp do primeiro anticorpo candidato. A primeira labilidade do Asp pode corresponder a uma primeira isomerização de ácido aspártico.

[0213] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um segundo índice a partir de uma segunda função objetiva. A segunda função objetiva pode incluir um segundo conjunto de fatores de escalonamento correspondentes ao segundo conjunto de parâmetros físico-químicos. O segundo índice pode corresponder ao segundo anticorpo candidato. O segundo índice pode corresponder a uma segunda labilidade do Asp do segundo anticorpo candidato. A segunda labilidade do Asp pode corresponder a uma segunda isomerização de ácido aspártico.

[0214] Cada conjunto de fatores de escalonamento de flutuação  $\alpha$ -carbono correspondente à flutuação  $\alpha$ -carbono, um fator de escalonamento SASA Asp correspondente à SASA Asp, e um fator de escalonamento SASA de nitrogênio da cadeia principal correspondente à SASA de nitrogênio da cadeia principal.

[0215] A primeira função objetiva e a segunda função objetiva podem incluir os fatores de escalonamento para o primeiro anticorpo candidato e o segundo anticorpo candidato, respectivamente. Sob as mesmas condições de solução simuladas como o anticorpo para o qual são aplicados os métodos de determinação da aptidão de labilidade do Asp, as funções objetivas para os anticorpos candidatos podem ser idênticas à função objetiva utilizada nos métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Asp para anticorpos candidatos da mesma classe ou subclasse.

[0216] Se a subclasse do primeiro anticorpo candidato é a classe ou subclasse do segundo anticorpo candidato, o primeiro conjunto de fatores de escalonamento pode ser idêntico ao segundo conjunto de fatores de escalonamento. Se as condições da solução do primeiro anticorpo candidato são as condições de soluções do segundo anticorpo candidato, o primeiro conjunto de fatores de escalonamento pode ser idêntico ao segundo conjunto de fatores de escalonamento. Se os valores de solvatação em água do primeiro anticorpo candidato e segundo anticorpo candidato são os mesmos, o primeiro conjunto de fatores de escalonamento pode ser idêntico ao segundo conjunto de fatores de escalonamento.

[0217] O primeiro índice pode satisfazer o limite de labilidade do Asp do critério de design. O segundo índice pode satisfazer o limite de labilidade do Asp do critério de design.

[0218] Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato ou segundo anticorpo candidato para ser o anticorpo para uso no agente terapêutico com base no valor relativo do primeiro índice e segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato se o primeiro índice é menor do que o segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do segundo anticorpo candidato se o segundo índice é menor do que o primeiro índice. Os métodos podem compreender ainda a etapa de mensurar a labilidade do Asp do anticorpo selecionado. Os métodos podem compreender ainda a etapa de produção do anticorpo selecionado.

#### **LABILIDADE DO ASP MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0219] Os métodos de fabricação podem incluir o estabelecimento de um limite de labilidade do Asp para o anticorpo com base, por exemplo, na validade (vida útil) para o anticorpo. Os métodos de fabricação do anticorpo podem incluir uma ou mais etapas dos métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Asp. O anticorpo pode ser um agente terapêutico ou

pode estar incluído em um agente terapêutico.

[0220] Os métodos de fabricação podem incluir a identificação da validade (vida útil). A validade pode depender de uma labilidade do Asp do anticorpo que pode estar incluído no agente terapêutico. A labilidade do ácido aspártico pode corresponder à isomerização de ácido aspártico. O critério de design pode ser limite de labilidade. O limite de labilidade pode se basear em uma validade. O limite de instabilidade pode ser cerca de 2,5% /semana de isomerização de ácido aspártico.

[0221] Os métodos podem incluir a fabricação do anticorpo apenas se o índice não excede o limite, em que uma sequência de aminoácidos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo compreende um resíduo de ácido aspártico. O método pode compreender o estabelecimento de um limite de labilidade do ácido aspártico para o anticorpo, o limite de labilidade do ácido aspártico satisfazendo o critério de design; é feita a transmissão da informação estrutural do anticorpo através de uma rede; recepção através da rede de um índice que corresponde à labilidade do ácido aspártico do anticorpo, o índice calculado a partir da informação estrutural; determinação se o anticorpo possui uma labilidade ácido aspártico que satisfaz o critério de design; e apenas se o índice não excede o limite de viscosidade, a produção do anticorpo.

[0222] Os métodos pode compreender o estabelecimento de um limite de labilidade do ácido aspártico para o anticorpo, o limite de labilidade do ácido aspártico satisfazendo o critério de design; é feito o cálculo a partir da informação estrutural do anticorpo de um índice que corresponde à labilidade do ácido aspártico do anticorpo; a determinação se o anticorpo possui uma labilidade de ácido aspártico que satisfaz o critério de design; e apenas se o índice não excede o limite de labilidade de ácido aspártico, a produção do anticorpo.

[0223] Os métodos de fabricação podem incluir a quantificação por via eletrônica, a partir da informação estrutural do anticorpo, com o índice correspondendo à labilidade do Asp do anticorpo. A quantificação pode seguir os métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Asp do anticorpo.

[0224] O índice pode ser calculado pelo método compreendendo as etapas de: cálculo a partir da sequência de aminoácidos da CDR (i) flutuações da média da raiz quadrática (RMSF) de um carbono alfa associado com o resíduo de ácido aspártico, (ii) média temporal da área de superfície acessível ao solvente do resíduo de ácido aspártico, e (iii) média temporal da área de superfície acessível ao solvente de um átomo de nitrogênio da cadeia principal associado a um resíduo de aminoácido imediatamente adjacente ao resíduo de ácido aspártico; a seleção para o anticorpo de (i) um fator de escalonamento de flutuação, (ii) fator de escalonamento da área de superfície do resíduo de ácido aspártico, e (iii) fator de escalonamento da área de superfície do átomo de nitrogênio da cadeia principal; e o cálculo do índice a partir de uma função objetiva que compreende os fatores de escalonamento, em que o índice correspondente à labilidade do ácido aspártico. O resíduo de aminoácido imediatamente adjacente ao resíduo de ácido aspártico pode estar na posição N+1 em relação ao resíduo de ácido aspártico na posição N. Os fatores de escalonamento podem ser derivados de dados de pelo menos uma medição da labilidade de ácido aspártico do pelo menos um anticorpo teste. A medição da labilidade de ácido aspártico do pelo menos um anticorpo teste pode incluir a incubação do pelo menos um anticorpo teste em uma determinada temperatura, seguido pela aplicação de espectrometria de massa e técnicas baseadas em HPLC. A seleção dos fatores de escalonamento pode compreender a seleção a partir de um conjunto de fatores de escalonamento que compreende, para cada dentre uma ou mais condições de solução aquosa (i) um fator de escalonamento da flutuação, (ii) um fator de escalonamento da

área de superfície do resíduo de ácido aspártico; e (iii) um fator de escalonamento da área de superfície do átomo de nitrogênio da cadeia principal. Na função objetiva, o índice compreende a número de Euler elevado a soma (da flutuação X o fator de escalonamento de flutuação) mais (média temporal da área de superfície acessível ao solvente do resíduo de ácido aspártico X o fator de escalonamento da área de superfície do resíduo de ácido aspártico) mais (a média temporal da área de superfície acessível ao solvente de um átomo de nitrogênio da cadeia principal X o fator de escalonamento da área de superfície do átomo de nitrogênio da cadeia principal). As condições de solução aquosas podem compreender temperatura, pH, tipo de tampão e força iônica. As condições de solução aquosa podem compreender um tampão de 20 mM de histidina-acetato. As condições de solução aquosa podem compreender uma temperatura de cerca de 313 K. O índice é um primeiro índice e o primeiro índice pode ser arredondado para um algarismo significativo para a produção de um segundo índice, o segundo índice sendo zero correspondendo ao primeiro índice não excedendo o limite de viscosidade e o segundo índice sendo 1 correspondendo ao primeiro índice excedendo o limite de viscosidade. O resíduo de aminoácido imediatamente adjacente ao resíduo de ácido aspártico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste de glicina, treonina, ácido aspártico e alanina. Os métodos podem incluir a construção do anticorpo-alvo de tal modo que a labilidade do Asp do agente terapêutico não exceda o limite de labilidade do Asp.

[0225] Para cada exemplo de realização descrito na presente invenção, os métodos podem compreender a etapa de mutagenização de um ou mais resíduos de aminoácidos de um anticorpo pré-existente para gerar um anticorpo alvo de modo a que o índice do anticorpo alvo satisfaz o critério de design. Os métodos podem compreender ainda a etapa de mensurar a labilidade do Asp do anticorpo alvo. Os métodos podem compreender ainda a

etapa de produção do anticorpo alvo.

[0226] Os métodos podem incluir a determinação de uma sequência de aminoácidos para o anticorpo-alvo. A sequência de aminoácidos pode corresponder a um índice de labilidade do Asp que é inferior ao limite de labilidade do Asp.

[0227] Em exemplos de realização adicionais, a invenção provê anticorpos selecionados, produzidos e/ou determinados para satisfazer o critério de design de labilidade do ácido aspártico pelos métodos e aparelhos descritos na presente invenção.

#### **LABILIDADE DO TRIPTOFANO**

[0228] A característica físico-química pode ser a labilidade do triptofano (Trp) do anticorpo. A labilidade do Trp pode corresponder a uma oxidação do resíduo Trp. O resíduo Trp pode estar em uma CDR do anticorpo. O critério de design pode ser limite de labilidade do Trp. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a labilidade do Trp do anticorpo é igual ao limite de labilidade do Trp. O critério de design pode ser considerado satisfeito se a labilidade do Trp do anticorpo é menor do que o limite de labilidade do Trp. O limite de labilidade do Trp pode ser 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 ou 10% de oxidação. O limite de labilidade do Trp pode ser definido para o anticorpo sob um conjunto de condições definidas.

[0229] São discutidos abaixo os métodos baseados na labilidade do Trp para determinação da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico, seleção do anticorpo a partir de vários anticorpos candidatos, fabricação do anticorpo, modificação do anticorpo pré-existente e produção do anticorpo-alvo. Será compreendido que uma ou mais etapas a partir de um dos métodos pode(m) ser realizada(s) em combinação com uma ou mais etapas dos outros métodos.

**LABILIDADE DO TRP: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA APTIDÃO DO ANTICORPO**  
**PARA INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0230] Os métodos podem incluir a determinação, com base na labilidade do Trp, da aptidão do anticorpo para a inclusão no agente terapêutico. Os métodos podem incluir o cálculo, a partir da informação estrutural anticorpo, da média temporal SASA de um resíduo Trp em uma CDR. O cálculo pode usar simulações de MD. As simulações de MD podem empregar o conjunto de condições de solução simuladas e podem empregar a solvatação em água explícita.

[0231] Os métodos podem compreender as etapas de (a) cálculo, a partir da sequência de aminoácidos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo, de uma média temporal da SASA de um resíduo de triptofano; (b) comparação da média temporal da SASA com um valor de corte; e (c) etapa de determinação se o anticorpo tem a labilidade do triptofano que satisfaz o critério de design quando a média temporal da SASA for inferior ao valor de corte. O valor de corte pode ser uma SASA da cadeia lateral do triptofano de  $80 \text{ \AA}^2$ . A sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada (VH) e a sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve (VL) podem conter apenas um resíduo de triptofano.

[0232] Alternativamente, os métodos podem incluir a quantificação eletrônica do índice. O índice pode ser quantificado a partir da função objetiva. O índice pode corresponder à labilidade do Trp.

[0233] Os métodos podem incluir a comparação do índice para o limite de labilidade de Trp do critério de design para determinar se o anticorpo tem a labilidade de Trp que satisfaz o limite de labilidade de Trp do critério de design.

[0234] Na função objetiva, o índice pode depender do tempo médio da SASA Trp.

[0235] Os métodos podem compreender ainda a etapa de produzir o anticorpo que possui uma labilidade do Trp que satisfaz o critério de design.

**LABILIDADE DO TRP: MÉTODOS DE SELEÇÃO ENTRE ANTICORPOS CANDIDATOS PARA A INCLUSÃO EM UM AGENTE TERAPÊUTICO.**

[0236] Os métodos podem incluir a seleção do anticorpo com base na labilidade do Trp, a partir de dois ou mais anticorpos candidatos e pode incluir nenhuma, algumas ou todas as etapas dos métodos para a determinação da aptidão de labilidade do Trp.

[0237] Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento da primeira informação estrutural de um primeiro anticorpo candidato. A primeira informação estrutural pode incluir uma primeira sequência de aminoácidos de domínio variável do primeiro anticorpo candidato. Os métodos de seleção podem incluir o fornecimento de uma segunda informação estrutural de um segundo anticorpo candidato. A segunda informação estrutural pode incluir uma segunda sequência de aminoácidos de domínio variável do segundo anticorpo candidato.

[0238] Os métodos podem incluir o cálculo, a partir da primeira informação estrutural anticorpo, de uma primeira média temporal SASA de um primeiro resíduo Trp. O primeiro resíduo Trp pode estar em uma CDR do primeiro anticorpo candidato.

[0239] Os métodos podem incluir o cálculo, a partir da segunda informação estrutural anticorpo, de uma segunda média temporal SASA de um segundo resíduo Trp. O segundo resíduo Trp pode estar em uma CDR do segundo anticorpo candidato.

[0240] Os métodos podem compreender a seleção do primeiro ou segundo anticorpo, se o primeiro ou segundo anticorpo tem uma média temporal da SASA do resíduo Trp que é inferior ao valor de corte.

[0241] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um primeiro índice a partir de uma primeira função objetiva. O primeiro índice pode corresponder ao primeiro anticorpo candidato. O primeiro índice pode corresponder a uma primeira labilidade do Trp do primeiro anticorpo candidato. A primeira labilidade do Trp pode corresponder a uma primeira oxidação do triptofano.

[0242] Os métodos podem incluir a quantificação eletrônica de um segundo índice a partir de uma segunda função objetiva. O segundo índice pode corresponder ao segundo anticorpo candidato. O segundo índice pode corresponder a uma segunda labilidade do Trp do segundo anticorpo candidato. A segunda labilidade do Trp pode corresponder a uma segunda oxidação do triptofano.

[0243] O primeiro índice pode satisfazer o limite de labilidade do Trp do critério de design. O segundo índice pode satisfazer o limite de labilidade do Trp do critério de design.

[0244] Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato ou segundo anticorpo candidato para ser o anticorpo para uso no agente terapêutico com base no valor relativo do primeiro índice e segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do primeiro anticorpo candidato se o primeiro índice é menor do que o segundo índice. Os métodos podem incluir a seleção do segundo anticorpo candidato se o segundo índice é menor do que o primeiro índice.

#### **LABILIDADE DO TRP: MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE UM AGENTE TERAPÊUTICO**

[0245] Os métodos de fabricação podem incluir o estabelecimento de um limite labilidade do Trp para o anticorpo. Os métodos de fabricação do agente terapêutico podem incluir uma ou mais etapas dos métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Trp. O limite de labilidade do Trp pode se basear na validade para o anticorpo. A labilidade do triptofano pode

corresponder à oxidação do triptofano. O anticorpo pode ser um agente terapêutico.

[0246] Os métodos de fabricação podem incluir a identificação da validade (vida útil). A validade pode depender de uma labilidade do Trp do anticorpo que pode estar incluído no agente terapêutico.

[0247] A invenção também provê métodos para a produção de um anticorpo que tenha uma labilidade do triptofano que satisfaz um critério de design, em que o referido método compreende a transmissão de informações estruturais do anticorpo através de uma rede; a recepção através da rede de uma média temporal da área de superfície acessível ao solvente de um resíduo de triptofano de uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo, a média temporal da área de superfície acessível ao solvente calculada a partir da informação estrutural, a partir de uma sequência de aminoácidos da CDR; comparação da média temporal da área de superfície acessível ao solvente com um valor de corte; e determinação se o anticorpo tem uma labilidade do triptofano que satisfaz o critério de design quando a média temporal da área de superfície acessível ao solvente for inferior ao valor de corte; e apenas se o anticorpo é determinado como tendo uma labilidade do triptofano que satisfaz o critério de design, é feita a produção do anticorpo.

[0248] Os métodos podem incluir a etapa de cálculo de uma média temporal da SASA tempo de um resíduo de triptofano; comparando a média temporal da SASA como um valor de corte; e determinação se o anticorpo tem a labilidade do triptofano que satisfaz o critério de design quando a média temporal da SASA for inferior ao valor de corte. Os métodos podem compreender ainda a produção do anticorpo que satisfaz o critério de design.

[0249] Para cada leito exemplo de realização descrito na presente invenção, um valor de solvatação em água pode ser uma base de cálculo da média temporal da área de superfície acessível ao solvente. A solvatação em

água pode ser um parâmetro em simulações de dinâmica molecular usando modelagem por computador. A simulação de dinâmica molecular pode ser realizada usando o *software* de simulação AMBER. O valor de corte pode ser uma área de superfície acessível ao solvente da cadeia lateral do triptofano de 80 Å<sup>2</sup>. A área de superfície acessível ao solvente da cadeia lateral do triptofano pode ser determinada utilizando o *software* AREAIMOL. As sequências de aminoácidos de todas as seis CDRs do anticorpo pode conter apenas um resíduo de triptofano. O método pode compreender ainda a etapa de mensurar a labilidade do Trp quando o anticorpo é determinado por ter uma labilidade do Trp que satisfaz o critério de design.

[0250] Os métodos de fabricação podem incluir a quantificação por via eletrônica, a partir da informação estrutural do anticorpo, com o índice correspondendo à labilidade do Trp do anticorpo. A quantificação pode seguir os métodos para a determinação da aptidão da labilidade do Trp do anticorpo.

[0251] Os métodos podem incluir a fabricação do anticorpo apenas se o índice não ultrapassa o limite.

[0252] Os métodos podem incluir a substituição do resíduo Trp por outro resíduo que não seja o Trp no anticorpo pré-existente para gerar um anticorpo alvo. Os métodos podem compreender ainda a etapa de produção do anticorpo alvo.

[0253] Em exemplos de realização adicionais, a invenção provê anticorpos selecionados, produzidos e/ou determinados para satisfazer o critério de design de labilidade do triptofano pelos métodos e aparelhos descritos na presente invenção.

### **EXEMPLOS**

#### **MÉTODOS EXEMPLARES**

[0254] Deve ser compreendido que os anticorpos-teste podem ser incluídos no conjunto de treino de anticorpos discutidos abaixo.

[0255] Deve ser compreendido que os fatores de escalonamento podem ser referidos como “coeficientes” na discussão abaixo.

[0256] Deve ser compreendido que nenhuma das características descritas em conexão com os Métodos Exemplares ou resultados ilustrativos pretendem limitar a invenção ao método exemplar ou resultado ilustrativo à característica descrita.

#### **MABS**

[0257] Os anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados eram anticorpos monoclonais IgG<sub>1</sub> exemplares obtidos pela expressão em células de ovário de hamster chinês e purificados por uma série de métodos de cromatografia em proteína A e cromatografia de troca iônica.

#### **PARÂMETROS ESTRUTURAIIS BASEADOS NA SEQUÊNCIA**

##### **CARGA**

[0258] A carga líquida para uma determinada sequência em um determinado pH foi calculada somando-se a contribuição de todos os aminoácidos carregados usando pKa conhecidos das cadeias laterais (vide, por exemplo, Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. Biochemistry. (W.H. Freeman, Basingstoke)) e a equação de Henderson Hasselbalch. O pKa da Cis não foi considerado assumindo que todas as Cis estão envolvidas na formação de bissulfeto.

##### **PARÂMETRO ASSIMETRIA DE CARGA DE FV (FvCAP)**

[0259] FvCAP foi desenvolvido para capturar a assimetria de carga entre os domínios VH e VL. FvCAP foi simplesmente calculado pela obtenção do produto entre a carga líquida sobre o domínio VH e domínio VL. Dessa forma um produto negativo representa a assimetria de carga entre os dois domínios, ao passo que um produto positivo representaria um sinal semelhante das cargas sobre os dois domínios.

### **ÍNDICE DE HIDROFOBICIDADE (HI)**

[0260] O HI foi desenvolvido para representar a proporção relativa de aminoácidos hidrofóbicos para aminoácidos hidrofílicos. A força hidrofóbica relativa de cada aminoácido foi ponderada utilizando a escala de hidrofobicidade de Eisenberg nestes cálculos (vide, por exemplo, Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C. & Wilcox, W. *Hydrophobic moments and protein structure. Faraday Symposia of the Chemical Society* 17, 109-120 (1982)). Todos os aminoácidos com um valor de escala positivo foram classificados como hidrofóbicos, ao passo que aqueles com valores de escala negativos foram classificados como hidrofílicos.

[0261] O HI foi definido como:  $HI = (n_i E_i / n_j E_j)$ , em que i representa os aminoácidos hidrofóbicos, ou seja, A, F, I, L, V, W, Y; e j representa os aminoácidos hidrofílicos, ou seja, D, E, G, H, K, M, N, Q, R, S, T; n é o número de cada aminoácido e E é o valor da escala de Eisenberg de cada aminoácido. O cálculo pode ser realizado sobre uma estrutura 3-D de uma proteína que, em tal cálculo, o parâmetro n é substituído por S, onde S é definido como a SASA de cada um dos aminoácidos (Fig. 16).

### **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

#### **VISCOSIDADE**

[0262] As medições de viscosidade foram realizadas utilizando um reômetro de cilindro concêntrico e cone e placa *Anton Paar Physica MCR 501* (Anton Paar, Graz, Áustria). As soluções de anticorpos foram ajustadas para atingir as concentrações, em seguida, 70 µL de cada solução de proteína de amostra foram distribuídos sobre a placa de amostra e o cone foi baixado. As amostras foram protegidas contra a evaporação e a temperatura foi controlada a 25 +/- 5 °C. A viscosidade da amostra foi determinada pela medição de torque a cada 60 segundos utilizando uma taxa de cisalhamento constante de 1000 s<sup>-1</sup>. As medições de viscosidade foram reportadas como

média das medições da viscosidade estabilizadas utilizando três replicatas. A análise da amostra e dados divulgados foram feitos com o uso do *software Anton Paar RheoPlus*.

#### **DEPURAÇÃO**

[0263] Os valores de depuração em macacos *Cyno* utilizados neste estudo foram obtidos a partir de dados publicados anteriormente (vide, por exemplo, Hötzel, I. *et al. A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. mAbs* 4, 753-760).

#### **SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)**

##### **ESTRUTURAS DE PARTIDA DA MD**

[0264] As estruturas dos Fabs foram obtidas a partir da estrutura cristalina em 3-D (se disponível) ou um modelo de homologia gerado usando uma adaptação local do programa *Modeller* (vide, por exemplo, Sali, A. & Blundell, T.L. *Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. J Mol Biol* 234, 779-815 (1993)). O domínio de Fab foi utilizado como a estrutura de partida para a MD antes da adição de íons (se necessário), e moléculas de solvente explícitos.

##### **MD USANDO GROMACS PARA ANÁLISE DE ISOMERIZAÇÃO DO ASPARTATO.**

[0265] Simulações de DM do Fab foram realizadas com o pacote de *software* de simulação *GROMACS* 4.0 (vide, por exemplo, Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. *GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 435-447 (2008)). O campo de força OPLSAA (vide, por exemplo, Jorgensen W.L., Maxwell, D.S. & TiradoRives, J. *Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. J Am Chem Soc* 118, 11225-11236 (1996); Xu, Z.T., Luo, H.H. & Tieleman, D.P. *Modifying the OPLS-AA force field to improve hydration free energies for several amino acid side chains using new atomic*

*charges and an off-plane charge model for aromatic residues. J Comput Chem* 28, 689-697 (2007)) foi utilizado para calcular os movimentos atômicos. O estado de carga dos resíduos tituláveis foi avaliado usando o método empírico PROPKA (vide, por exemplo Li, H., Robertson, A.D. & Jensen, J.H. *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. Proteins* 61, 704-721 (2005); Bas, D.C., Rogers, D.M. & Jensen, J.H. *Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. Proteins* 73, 765-783 (2008)). Todos os resíduos foram definidos por seus estados de protonação canônica.

[0266] Os fragmentos Fab e Fv foram totalmente solvatados com moléculas de água TIP3P (vide, por exemplo, Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. & Klein, M.L. *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. J Chem Phys* 79, 926-935 (1983)). Aproximadamente 10.000 moléculas de água foram utilizadas para o solvatar o Fv e 25.500 moléculas de água foram utilizadas para solvatar o Fab. Átomos de cloro ou sódio foram adicionados para neutralizar a carga global do sistema quando necessário. Condições periódicas de contorno octaédricas foram usadas em cada uma das simulações. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando PME (vide, por exemplo, Darden, T., York, D. & Pedersen, L. *Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. J Chem Phys* 98, 10089-10092 (1993)) com o valor de corte do espaço real eletrostático de 1,0 nm. O potencial de Lennard-Jones, descrevendo a interação de van der Waals, foi cortada em 1,0 nm. O algoritmo Settle (vide, por exemplo, Miyamoto, S. & Kollman, P.A. *Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. J Comput Chem* 13, 952-962 (1992)) foi usado para restringir os comprimentos de ligação e ângulos das moléculas de água, *Lincs* foi usado para restringir todos os outros comprimentos de ligação (vide, por exemplo, Hess, B., Bekker, H.,

Berendsen, H.J.C. & Fraaije, J.G.E.M. *LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. J Comput Chem* 18, 1463-1472 (1997)), e o algoritmo *vsite* no *Gromacs 4.0* foi usado para remover os movimentos de alquila e amida de hidrogênio, permitindo um passo de tempo (*time-step*) de 4 femtosegundo (fs).

[0267] Ao longo destas simulações, a temperatura foi mantida constante pelo acoplamento do sistema a um banho na temperatura de 300 K, utilizando o algoritmo V-Rescale (vide, por exemplo, Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. *Canonical sampling through velocity rescaling. J Chem Phys* 126, (2007)). Durante um equilíbrio de 200 picosegundos (ps) permitindo que a densidade do sistema convergisse, a pressão foi mantida constante pelo acoplamento do sistema a um banho de pressão de 1,0 atm (vide, por exemplo, Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Vangunsteren, W.F., Dinola, A. & Haak, J.R. *Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. J Chem Phys* 81, 3684-3690 (1984)). Após o equilíbrio, as simulações foram mantidas a um volume constante. Trajetórias dessas simulações foram analisadas com diversas ferramentas disponíveis no conjunto de programas *GROMACS*. Todas as SASAs são calculadas usando *g\_sas* do *GROMACS* (vide, por exemplo, Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C. & Scharf, M. *The double cube lattice method: efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. J. Comp. Chem.* 16, 273-284 (1995)); cálculo de informação mútua é implementado localmente semelhante ao Lange e Grubmüller (vide, por exemplo, Kortkhonjia, E. *et al. Solution dynamics of monoclonal antibodies: Experimental and computational approach. mAb* In Press (2013); Lange, O.F. & Grubmuller, H. *Full correlation analysis of conformational protein dynamics. Proteins-Structure Function and Genetics* 70, 1294-1312 (2008)); entropia de Shannon para distribuições  $\phi$ - $\psi$  é calculada como  $S = - \sum_{\{\phi_i, \psi_j \text{ bins}\}} p(i,j) \log$

( $p(i,j)$ ), onde  $p(i,j)$  é a probabilidade de encontrar  $\{\phi, \psi\}$  no compartimento (*bin*)  $\{\phi_i, \psi_j\}$ , os compartimentos são definidos por grades  $3^0$  e distribuições  $\phi$ - $\psi$  são dos algoritmos *g\_rama*; *g\_rsmf*, *g\_hbond*, e *dssp* do *GROMACS* foram utilizados para calcular flutuações na raiz quadrada média, ligações de hidrogênio, e o estado da estrutura secundária, respectivamente. Os detalhes da metodologia analítica para a entropia de Shannon e a informação mútua foram publicados anteriormente (vide, por exemplo, Kortkhonjia, E. *et al. Solution dynamics of monoclonal antibodies: Experimental and computational approach. mAb In Press* (2013)).

#### **MD USANDO AMBER PARA ANÁLISE DA OXIDAÇÃO DO TRIPTOFANO**

[0268] Simulações de MD dos fragmentos Fab foram realizadas com o pacote de *software* para simulação Amber 11 (vide, por exemplo, D.A. Case, T.A.D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg,, G. Seabra, I.K., K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. & Mathews, M.G.S., C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, e P.A. Kollman *University of California*, San Francisco; 2011)). Foi utilizado o campo de força de carga fixa FF99SB. Todos os resíduos foram definidos por seus estados de protonação canônica com base em seus pKa termodinâmicos.

[0269] Os fragmentos Fab foram totalmente solvatados com moléculas de água TIP3P. Aproximadamente 35.000 moléculas de água foram usadas para solvatar o Fab. Átomos de cloreto ou sódio foram adicionados para neutralizar a carga global do sistema. Condições periódicas de contorno octaédricas foram usadas em cada uma das simulações. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando PME com um corte eletrostático de 0,8 nm. O algoritmo SHAKE foi usado para remover movimentos alquila e

amida de hidrogênio, permitindo a utilização de um passo de tempo de 3 fs.

[0270] Ao longo destas simulações, a temperatura foi mantida constante pelo acoplamento do sistema a um banho de temperatura de 300 K, utilizando a dinâmica de Langevin, com uma frequência de colisão de 3/pseg. Durante a minimização de energia, equilíbrio, e os subsequentes ciclos de produção, a pressão foi mantida constante pelo acoplamento do sistema a um banho de pressão a 1,0 atm.

[0271] Trajetórias de simulações MD foram analisadas com ferramentas disponíveis publicamente. Todas as SASAs são calculadas usando *areaamol*, um programa que faz parte do programa CCP4 (vide, por exemplo, Bailey, S. *The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. Acta Crystallogr D* 50, 760-763 (1994)). A SASA foi determinada para cada triptofano de cadeia lateral, não incluindo os átomos do esqueleto do peptídeo.

#### **OXIDAÇÃO DO TRP INDUZIDA POR DIHIDROCLORETO DE 2,2'-AZOBIS (2-AMIDINOPROPANO) (AAPH)**

[0272] A oxidação induzida por AAPH foi realizada pela mistura da solução de mAb com o AAPH em concentrações finais de 1 mg/mL e 1 mM, respectivamente (vide, por exemplo, Ji, J.A., Zhang, B., Cheng, W. & Wang, Y.J. *Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 4485-4500 (2009)). As soluções foram incubadas a 40 °C durante 16 horas. A reação foi extinta pela adição de 20 mM de Met seguido pela troca de tampão por um tampão de 20 mM, pH 5,5 utilizando colunas de dessalinização PD-10. As soluções foram então analisadas utilizando digestão trípica seguido por LC-MS/MS para a oxidação do Trp sítio-específica. Os cromatogramas de íons extraídos de peptídeos correspondentes foram integrados manualmente usando um *Xcalibur Qual Browser*. A percentagem relativa de oxidação foi subsequentemente calculada dividindo a área de pico a partir dos íons de

peptídeos oxidados pela soma das áreas de picos a partir dos peptídeos oxidados e não oxidados correspondentes.

#### **DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DAS TAXAS DE DEGRADAÇÃO DO ASP**

[0273] As soluções de mAb foram trocadas de tampão usando tubos de ultrafiltração *Centricon* com uma formulação final de proteínas de 5 mg/mL em 20 mM de uma solução tamponada em pH 5,5, 240 mM de sacarose. As amostras foram colocadas a 40 °C e retiradas em t = 0, 14 dias e 28 dias.

#### **MAPEAMENTO DE PEPTÍDEO TRÍPTICO POR LC-MS/MS**

[0274] Amostras submetidas ao estresse térmico foram analisados por meio de digestão trípica de peptídeo, seguido por LC-MS/MS. As amostras de proteínas foram digeridas de acordo com protocolos publicados com pequenas modificações (vide, por exemplo, Yu, X.C. *et al. Accurate determination of succinimide degradation products using high fidelity trypsin digestion peptide map analysis. Analytical chemistry* 83, 5912-5919 (2011)).

[0275] O mapeamento de peptídeos foi realizado em um sistema HPLC Agilent 1200 equipado com uma coluna Júpiter C18 (Phenomenex, 2,0x250 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e acoplado a um espectrômetro de massa Thermo Fisher LTQ Orbitrap. O Solvente A consistia em 0,1% de TFA em água e o solvente B consistia em 0,09% de TFA em 90% de acetonitrila. Um gradiente de duas etapas foi utilizado; 0 - 10% de B em 20 minutos seguido de 10 a 40% B durante 137 minutos. A velocidade de fluxo foi de 0,25 mL/min, a temperatura da coluna era de 55 °C e a carga de proteína foi de 22 µg. O nível de degradação em cada local foi determinado por cromatografia de íons extraídos (EIC), utilizando o software *Xcalibur* (vide, por exemplo, Yu, X.C. *et al. Accurate determination of succinimide degradation products using high fidelity trypsin digestion peptide map analysis. Analytical chemistry* 83, 5912-5919 (2011)).

### **ANÁLISE DE REGRESSÃO**

[0276] A análise de regressão logística e regressão por componentes principais foram realizadas utilizando o XLSTAT® (Addinsoft, Nova Iorque, NY).

### **RESULTADOS ILUSTRATIVOS**

#### **VISCOSIDADE**

[0277] A viscosidade pode ser importante para a fabricação e fornecimento de soluções de mAb em alta concentração (vide, por exemplo, Shire, S.J., Shahrokh, Z. & Liu, J. *Challenges in the development of high protein concentration formulations. Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 1390-1402 (2004)). Observou-se que os mAbs, diferindo apenas em grande parte na sequência da Região Determinante de Complementaridade (CDR), podem apresentar uma variedade de perfis de viscosidade-concentração sob condições semelhantes de tensão de cisalhamento (Fig. 7). Para a IgG de isotipo semelhante, o domínio variável Fv (e as CDRs dentro) pode desempenhar um papel importante na definição das interações intermoleculares que conduzem a diferenças na viscosidade (vide, por exemplo, Kanai, S., Liu, J., Patapoff, T. & Shire, S.J. *Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab-Fab interaction that impacts solution viscosity. Journal of Pharmaceutical Sciences* (2008); Liu, J., Nguyen, M.D.H., Andya, J.D. & Shire, S.J. *Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution. Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1928-1940 (2005)). Um dos objetivos da presente invenção foi o de determinar quais parâmetros podem ser extraídos a partir das CDRs e Fv para capturar os elementos hidrofóbicos e eletrostáticos que contribuem (vide, por exemplo, Du, W. & Klibanov, A.M. *Hydrophobic salts markedly diminish viscosity of concentrated protein solutions. Biotechnology and Bioengineering* 108, 632-636; Yadav, S.,

Liu, J., Shire, S.J. & Kalonia, D.S. *Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity. Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 1152-1168). O foco foi apenas na sequência uma vez que esta forneceu os meios mais simples de geração e análise de dados. Entretanto, deve se observar que qualquer um dos parâmetros como discutido abaixo calculado a partir da sequência pode ser facilmente calculado também a partir da estrutura (Figs. 15 e 16).

[0278] Os parâmetros calculados foram: a) carga líquida de Fv a um determinado pH (por exemplo, pH 5,5), b) Parâmetro de Assimetria de carga do Fv (FvCAP), e c) índice de hidrofobicidade (HI) das CDRs ou Fv. A carga líquida pode potencialmente contribuir para interações repulsivas, enquanto FvCAP e HI poderiam contribuir para interações atrativas. O parâmetro FvCAP representa a assimetria de cargas entre o domínio VH e VL. Postula-se que a carga líquida oposta entre a dos domínios VH e VL (FvCAP negativo) poderia fornecer uma oportunidade para o domínio Fv interagir com outro domínio Fv através de uma interação similar a dipolo ou com um outro *patch* de carga presente no mAb (vide, por exemplo, Yadav, S., Liu, J., Shire, S.J. & Kalonia, D.S. *Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity. Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 1152-1168; Yadav, S. *et al. Establishing a Link Between Amino Acid Sequences and Self-Associating and Viscoelastic Behavior of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. Pharmaceutical Research* 28, 1750-1764). Era esperado que um valor FvCAP negativo maior levasse a interações atrativas mais fortes em comparação com valores positivos ou negativos menores. Note que a conformação estrutural real poderia distribuir a assimetria de carga de um modo que pode não ser capturada como definido acima pela sequência, ainda, nos cálculos, a abordagem baseada em sequência como a primeira aproximação forneceu um meio simples de capturar a falta de simetria da carga

em pelo menos uma dimensão. Quando comparadas a diversos mAbs (Figs. 8A-8C), uma vasta gama destes parâmetros foi observada, mesmo que a diferença principal na sequência encontra-se na região CDR (todos mAbs de isotipo IgG1). Os valores de HI calculados a partir das CDRs tenderam aos mesmos calculados a partir de Fv (Fig. 17), conseqüentemente os anteriores foram utilizados para futura análise.

[0279] Em seguida, foram examinadas correlações entre estes parâmetros e valores de viscosidade experimentais sob duas condições de solução diferentes utilizando um conjunto de treinamento de 10 mAbs. As duas condições da solução diferentes eram uma solução tampão a 20 mM (histidina acetato) de baixa força iônica em pH 5,5 (Fig. 9A-9C) e uma solução tampão a 20 mM (acetato de histidina) de elevada força iônica (+ 200 mM de cloridrato de arginina) em pH 5,5 (Fig. 10A-10C). Para o tampão de baixa força iônica, foi observada uma correlação equitativa entre a carga Fv e viscosidade ( $r$  de Pearson = -0,8) e entre FvCAP e viscosidade ( $r$  de Pearson = -0,9). No entanto, foi observada apenas uma fraca correlação entre HI e viscosidade. Assim, as interações eletrostáticas parecem desempenhar um papel dominante na modulação da viscosidade com a hidrofobicidade contribuindo em um menor grau com a viscosidade global de estes mAbs. Uma correlação mais forte entre a viscosidade e FvCAP apontou para o fato de a assimetria de carga entre o domínio VH e VL potencialmente desempenhou um papel na modulação da viscosidade. Para o tampão de elevada força iônica (Figs. 10A-10C), as correlações existentes entre carga de Fv e viscosidade ( $r$  de Pearson = -0,9) e entre FvCAP e viscosidade ( $r$  de Pearson = -0,8). Observou-se uma correlação fraca entre HI e viscosidade, o que sugere que sob estas condições todos os parâmetros contribuem para a modulação da viscosidade.

[0280] Em seguida, a análise de regressão por componentes principais (PCR - *Principal Component Regression*) foi utilizada como uma

ferramenta de regressão multivariada (múltiplas variáveis) para avaliar a sua utilidade de ser capaz de desenvolver um modelo preditivo para a viscosidade. Os dados de viscosidade sob condições de tampão de elevada força iônica foram utilizados como um exemplo de processo juntamente com os parâmetros teoricamente obtidos (Fig. 1A). Dados de viscosidade a 150 mg/mL e 180 mg/mL a 25 °C foram utilizados como variáveis independentes, enquanto carga Fv em pH 5,5 (também pode ser representada como q), o FvCAP em pH 5,5 (também pode ser representado como q<sub>CAP</sub>) e HI (também pode ser representado como φ) foram utilizados como variáveis dependentes. A Fig. 1B exibe dados de viscosidade e parâmetros calculados que não incluem o HI, para condições de baixa força iônica a 150 mg/mL a 25°C para um conjunto de treinamento de 10 de mAb (parcialmente sobrepondo o conjunto de treinamento em alta força iônica de 10 mAbs). As Figs. 11A e 11B mostram os resultados da análise da PCR utilizando o conjunto de treino de elevado força iônica mencionado acima para 150 mg/mL e 180 mg/mL, respectivamente, onde os valores de viscosidade experimentais observados são representados graficamente em função dos valores de viscosidade preditos, tal como obtido através da equação de melhor ajuste dentro do intervalo de confiança de 90%. A equação de melhor ajuste é descrita abaixo:

$$\eta(180 \text{ mg/mL}, 25^\circ\text{C}) = 10^{(1,19 + 0,42\phi - 0,05*q - 0,017*q_{\text{CAP}})} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\eta(150 \text{ mg/mL}, 25^\circ\text{C}) = 10^{(0,90 + 0,34\phi - 0,036*q - 0,012*q_{\text{CAP}})} \quad \text{Eq. 2}$$

[0281] Em experimentos adicionais, um conjunto de treinamento de 14 mAbs foi testado. Ao invés de calcular o HI da CDR, nestes experimentos foi calculado o HI do Fv. A análise de regressão por componentes principais (PCR - *Principal Component Regression*) foi utilizada como uma ferramenta de regressão multivariada para avaliar sua utilidade na capacidade de desenvolver um modelo preditivo para a viscosidade. A Fig. 11C mostra o resultado da análise da PCR em que os valores de viscosidade experimentais observados a

180 mg/mL para diversos mAbs são representados graficamente contra os valores preditos da viscosidade tal como obtido pela equação do melhor ajuste dentro do intervalo de confiança de 90%. A equação de melhor ajuste é descrita abaixo:

$$\eta(180 \text{ mg/mL}, 25^\circ\text{C}) = 10^{(0,15 + 1,26\phi - 0,043*q - 0,020*q_{\text{CAP}})} \quad \text{Eq. 1 -1}$$

$$\eta(150 \text{ mg/mL}, 25^\circ\text{C}) = 10^{(0,06 + 1,13\phi - 0,034*q - 0,014*q_{\text{CAP}})} \quad \text{Eq. 2-1}$$

[0282] Observe que os coeficientes podem ser específicos para este sistema de tampão e a respectiva concentração de proteína. Em geral, uma forte correlação ( $r$  de Pearson = 0,9) e um erro médio absoluto de  $7 \pm 9$  a 180 mg/mL entre os valores observados e preditos demonstra que o modelo funciona bem para a obtenção dos valores de viscosidade utilizando os parâmetros teóricos calculados a partir da sequência do anticorpo. Para testar adicionalmente a validade do modelo, utilizou-se uma abordagem validação cruzada deixando um de fora (LOOCV), em que o valor de viscosidade para cada um dos mAbs foi utilizado como ponto de validação de dados, enquanto que os valores de viscosidade para o resto dos mAbs foram usados como conjunto de treino. A análise da PCR foi realizada no conjunto de treino e o resultado do modelo utilizando os parâmetros foi utilizado para prever a viscosidade do mAb “deixado de fora”; as etapas foram repetidas para cada mAb. A Fig. 11D mostra um gráfico de valores experimentais de viscosidade observados a 180 mg/mL representados graficamente contra as previsões LOOCV. Uma forte correlação é observada ( $r$  de Pearson = 0,8) com um erro médio absoluto de  $9 \pm 10$  entre os valores de viscosidade observados e preditos.

[0283] Da mesma forma, a análise da PCR foi utilizada como a ferramenta de regressão multivariada para desenvolver um modelo preditivo de viscosidade sob condições de tampão de baixa força iônica. Um conjunto de treino continha 10 mAbs a uma concentração de 150 mg/mL em tampão de

baixa força iônica (tampão de 20 mM de histidina). A Fig. 11E mostra o resultado da análise da PCR utilizando o conjunto de treinamento de 10 mAbs para 150 mg/mL, em que os valores de viscosidade experimentais observados são representados graficamente contra os valores preditos da viscosidade obtidos pela equação do melhor ajuste dentro do intervalo de confiança de 90%. A equação de melhor ajuste é descrita abaixo:

$$\eta(150 \text{ mg/mL}, 25^\circ\text{C}) = 10^{(0,81 + 0,21*q - 0,15*q_{\text{CAP}})} \quad \text{Eq. 3}$$

[0284] Observe que os coeficientes eram específicos para este sistema de tampão e as respectivas concentrações de proteína. Em geral, uma forte correlação entre os valores observados e preditos ( $r^2 = 0,8$ ), demonstrou que o modelo funcionou bem para a obtenção dos valores de viscosidade utilizando os parâmetros teóricos calculados a partir da sequência do anticorpo. Para testar a validade do modelo, o modelo foi implementado em quatro anticorpos diferentes fora do conjunto de treinamento. Usando os parâmetros teóricos e Equações 1 e 2, as viscosidades foram calculadas a 180 mg/mL e 150 mg/mL separadamente e, assumindo a viscosidade de 1,2 cP a 25 mg/mL e 0,8 a 0 mg/mL, uma curva de viscosidade - concentração teórica de quatro pontos foi gerada e comparada com os dados de viscosidade experimentais. As Figs. 12A-12D mostram essa comparação para quatro mAbs. O modelo teórico previu bem a concentração-viscosidade quando comparado com os dados experimentais. Assim, o modelo de equação obtido por meio da análise de regressão dos mínimos quadrados parciais, usando os parâmetros teóricos derivados da sequência, foi eficaz em prever as curvas de concentração-viscosidade para este sistema de proteína-tampão envolvendo os anticorpos do isotipo IgG<sub>1</sub>.

### DEPURAÇÃO

[0285] Diferentes anticorpos do mesmo isotipo podem apresentar diferenças notáveis na depuração plasmática em humanos, bem como em macacos *Cyno*. (Depuração plasmática em macacos *Cyno* (depuração *Cyno*) é

um modelo pré-clínico estabelecido para avaliar o perfil farmacocinético de mAbs (vide, por exemplo, Hötzel, I. *et al.* *A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. mAbs* 4, 753-760)). Alguns estudos têm mostrado que tais diferenças devem ser correlacionadas ao pl ou mutações específicas na sequência (vide, por exemplo, Igawa, T. *et al.* *Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. Protein Engineering Design and Selection* 23, 385-392; Wu, H. *et al.* *Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. Journal of Molecular Biology* 368, 652-665 (2007)). Com base na hipótese de que as diferenças em quaisquer propriedades observáveis de mAbs devem preferencialmente estar relacionadas com diferenças no Fv ou CDR (dentro da mesma estrutura), foi explorado determinar se qualquer uma das propriedades de sequência poderia prever as diferenças na depuração *Cyno*. A hipótese subjacente era que a depuração mais rápida era devido à ligação fora do alvo do mAb à superfícies/ou proteínas *in vivo* através de interações proteína-proteína aumentadas que eram hidrofóbicas e/ou eletrostáticas na natureza. Portanto, foi suposto que quaisquer extremos de tais propriedades no domínio variável, tais como o pl, carga ou hidrofobicidade se traduziria em um anticorpo que exibe uma depuração *Cyno* mais rápida. Com base em dados publicados, um valor de depuração  $\geq 10$  mL/kg/dia em macacos *Cyno* foi designado como depuração mais rápida e um valor  $< 10$  mL/kg/dia foi designado como uma depuração normal (vide, por exemplo, Hötzel, I. *et al.* *A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. mAbs* 4, 753-760)).

[0286] Um grande conjunto de classe IgG<sub>1</sub> de mAbs (45 mAbs) foi avaliado e comparado com a depuração *Cyno* na dose máxima administrada (variando de 10 mg/kg a 100 mg/kg) com o pl calculado do mAb e os valores de HI da sequência CDR (Figs. 13 A e 13B). Conforme relatado na literatura

(vide, por exemplo, Hötzel, I. *et al.* *A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance. mAbs* 4, 753-760), não foi observada nenhuma correlação clara entre o pI e depuração do mAb calculado ou entre o HI (calculado a partir da CDR ou Fv) e a depuração (dados não mostrados). Embora não se observou nenhuma correlação clara entre pI e a depuração ou HI e a depuração, observou-se que em altos valores de pI (~ 8,7 - 9,5) e baixos valores de pI (~ 6,4 - 7,1), bem como em altos valores HI (> 1,2), mais mAbs têm valores elevados de depuração. Não foi observada correlação entre a carga calculada do domínio Fv em pH 7,4 (pH fisiológico) e os valores de depuração (dados não mostrados).

[0287] Em seguida, foi examinado para determinar se pI (e/ou carga) e hidrofobicidade eram complementares entre si na definição de depuração mais rápida *versus* normal. Também foi explorado se carga em um determinado pH seria mais exigentes no que diz respeito aos valores de depuração (depuração de anticorpo envolve a salvação do receptor neonatal de Fc por meio do ambiente endossômico que tem um pH baixo, pH 5 - 6 (em que Fc é uma região C-terminal de uma cadeia pesada de anticorpo que contém pelo menos uma porção da região constante)) (vide, por exemplo, Wang, W., Wang, E.Q. & Balthasar, J.P. *Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther* 84, 548-558 (2008)). Consequentemente, explorou-se se existia correlação da carga Fv para depuração em toda a faixa de pH de 5,0 - 7,4. Também foi examinado se hidrofobicidade de certas CDRs se correlacionam melhor com a depuração em vez da hidrofobicidade global da sequência CDR. Com estas multiplicidades de variáveis, foi determinado que uma certa combinação destas variáveis seria mais discriminatória em relação à depuração.

[0288] Para simplificar a análise, um conjunto de treinamento de 13 mAbs foi gerado para cobrir toda a faixa de valores de depuração (Fig. 2).

Os mAbs no conjunto de treinamento foram organizados em ordem decrescente de valores de depuração. Foram avaliados critérios que permitiram a separação dos dois grupos de mAbs, ou seja, um grupo de mAbs com um valor de depuração  $\geq 10$  mL/kg/dia e um grupo de mAbs com um valor de depuração  $< 10$  mL/kg/dia. Conforme mencionado, a hidrofobicidade global de todas as CDRs não foi suficiente para a diferenciação. Além disso, a hidrofobia da CDR2 LC, CDR1 HC e CDR2 HC também não forneceram tal diferenciação, conforme mostrado pelo valor HI médio calculado para mAbs de rápida depuração contra mAbs de depuração normal. Por outro lado, foi observada uma tendência geral de que os mAbs de depuração mais rápida tendem a ter maior hidrofobicidade entre as 3 CDRs restantes (CDR1 LC, CDR3 LC, CDR3 HC). O valor HI médio para os mAbs de depuração rápida foi, em geral, maior em relação aos mAbs de depuração normal. Isto tornou-se ainda mais evidente usando uma soma calculada dos valores HI destas 3 CDRs. A soma HI média (CDR1 LC, CDR3 LC, e CDR3 HC) para os mAb no grupo de depuração mais rápida foi significativamente maior do que aqueles nos mAbs de depuração normal (3,9 +/- 1,4 contra 2,5 +/- 0,7, respectivamente,  $p = 0,005$ ). No que diz respeito a carga, notou-se que em pH 5,5, mAbs com valores de depuração normais tendem a ter valores de carga entre 0,4 – 6,1, enquanto 4 de 7 mAbs que depuram mais rápido tiveram valores de carga fora desta faixa. Além disso, verificou-se que a carga e HI seletiva das CDRs eram complementares entre si na diferenciação de mAbs que depuram mais rapidamente, ou seja, os mAbs com valores de carga entre 0,4 e 6,1 no grupo de depuração rápida tiveram uma soma HI relativamente mais elevada. Esta análise dos dados indicou que ambos os extremos da hidrofobicidade de determinadas CDRs, bem como os extremos de valores de carga (negativos ou altamente positivos) poderiam ser usados para prever os mAbs com depuração mais rápida.

[0289] A análise acima levou ao desenvolvimento de um critério

para diferenciar os mAbs com depuração mais rápida daqueles com depuração normal (Fig. 3). Se mAbs com o valor da soma HI  $> 4,0$  e/ou um valor de carga Fv  $\leq -2,0$  ou  $\geq 6,2$  (Fig, 2, com fundo tracejado em barra inclinada para esquerda) foram segregados com aqueles com o valor da soma de hidrofobicidade  $\leq 4,0$  e valores de carga Fv dentro de  $-2,0$  a  $6,2$  (Fig, 2, com fundo tracejado em barra inclinada para direita), mAbs com depuração mais rápida tornam-se claramente perceptíveis em comparação com mAbs de depuração normais.

[0290] Critérios teóricos foram estendidos ao conjunto completo de 45 mAbs para testar a sua validade. A fim de facilitar a visualização de tal análise foi utilizado o esquema de codificação com fundo tracejado acima descrito. A todos os valores da soma HI  $> 4,0$  foi atribuído um fundo tracejado em barra inclinada para esquerda e ao restante foi atribuído um fundo tracejado em barra inclinada para direita. Todos os valores de carga  $\leq -2,0$  ou  $\geq 6,2$  foram atribuídos a um fundo tracejado em barra inclinada para esquerda e ao restante foi atribuído um fundo tracejado em barra inclinada para direita. Todos os valores de depuração *Cyno*  $\geq 10$  foram atribuídos a um fundo tracejado em barra inclinada para esquerda e ao restante foi atribuído um fundo tracejado em barra inclinada para direita. Em seguida, os dados foram classificados com base nos valores crescentes de depuração mensurados para determinar se os padrões de hachuras eram correspondentes (e, portanto, se os critérios iriam prever o resultado à direita) (Fig. 4). De fato, os critérios se mantiveram bem para o conjunto completo de 45 mAbs. Com base na soma HI alta ou cargas Fv extremas, a depuração *Cyno* mais rápido para 15/16 (94%) mAbs (incluindo 6/6 no conjunto de treinamento original) e depuração *Cyno* normal para 24/29 (83%) mAbs (incluindo 7/7 no conjunto de treinamento original) foram preditas corretamente.

[0291] Em experimentos adicionais, o conjunto de treinamento foi

ampliado para 14 mAbs para desenvolver critérios para diferenciar mAbs de depuração mais rápida daqueles com depuração normal. Neste conjunto de treinamento, os mAbs com depuração mais rápida foram claramente separados a partir dos mAbs de depuração normal quando os critérios foram definidos de tal forma que os mAbs com o valor da soma HI  $> 4,0$  e/ou um valor carga Fv  $\leq 0$  ou  $\geq 6,2$  estariam em risco de exibir depuração mais rápida, enquanto aqueles mAbs com o valor da soma HI  $\leq 4,0$  e valor de carga Fv de  $0 - 6,2$  exibiriam depuração normal. Os critérios teóricos foram estendidos ao conjunto completo de 61 mAbs para testar a validade. Com base na soma HI alta ou carga Fv extrema, a foi alcançada predição correta para uma depuração *Cyno* mais rápida em 10/13 (77%) mAbs (excluindo 8/8 no conjunto de treinamento original, e 86% incluindo mAbs do conjunto de treino) e depuração *Cyno* normal em 24/34 (70%) (excluindo 6/6 mAbs no conjunto de treino original, 75% incluindo os mAbs do conjunto de treino) (dados não mostrados).

[0292] Estas análises estabeleceram a capacidade de utilizar as propriedades moleculares fundamentais, tais como carga e hidrofobicidade, para avaliar as propriedades biológicas, neste caso, tal como a depuração. A análise dá suporte a hipótese de que a ligação não específica foi responsável pela rápida depuração no plasma, pois o domínio variável com extrema hidrofobicidade ou carga pode potencialmente interagir com outros elementos de superfície além do antígeno alvo.

#### **OXIDAÇÃO DE TRP E ISOMERAÇÃO DE ASP**

[0293] Modificações químicas, tais como oxidação de Trp e isomerização de Asp e as perdas associadas na potência podem limitar a validade (vida útil) de produtos de mAb em soluções aquosas. Simulações de DM totalmente atômica foram empregadas com água explícita para permitir uma classificação de risco em relação à oxidação de Trp e isomerização de Asp.

[0294] Para a oxidação Trp, foi examinada a correlação entre MD gerada na média temporal SASA e extensão da oxidação dos resíduos de Trp na presença de dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH, um produto químico conhecido por oxidar aminoácido lábil das cadeias laterais) (vide, por exemplo, Ji, J.A., Zhang, B., Cheng, W. & Wang, Y.J. *Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 4485-4500 (2009)). AAPH gerou radicais livres orgânicos que levam à oxidação das cadeias laterais expostas. Foi, conseqüentemente, levantada a hipótese de que a SASA poderia fornecer uma indicação direta da propensão de uma Trp oxidar em solução se uma espécie oxidante fosse introduzida na solução durante a fabricação ou armazenamento. A Fig. 5 lista 38 resíduos Trp em 17 mAbs diferentes. Todos estes Trps estavam presentes nas CDRs, exceto para os últimos 9 Trps, que estavam presentes na região constante.

[0295] Um critério foi definido, onde os Trps com > 35% de oxidação na presença de AAPH foram designados como Trps lábeis à oxidação, enquanto que abaixo desta percentagem os Trps foram designados como Trps não lábeis. Os resíduos de Trp com uma oxidação > 35% foram codificados com um fundo tracejado atribuído para a esquerda, e aqueles Trps abaixo dessa porcentagem foram codificados com um fundo tracejado atribuído para a direita, e todos os Trps foram classificados com base na oxidação (Fig. 5). Um padrão foi facilmente reconhecível, a média da média temporal SASA de resíduos de Trp lábeis foi significativamente mais elevada ( $122 \text{ \AA}^2 \pm 40$ ) em comparação com os não lábeis ( $37 \text{ \AA}^2 \pm 41$ ), com um valor-p de 0,0001. Com base nesta análise, e para minimizar o número de falsos negativos, um valor de corte da SASA da cadeia lateral >  $80 \text{ \AA}^2$  (SASA > 30% para Trp de cadeia lateral) foi atribuído para correlacionar com os sítios Trp lábeis e para capacitar a distinção entre sítios reativos e não reativos. Este critério identificou

corretamente 13/14 (93%) resíduos de Trp lábeis e 20/24 (83%) resíduos de Trp não lábeis. Notou-se que para as moléculas em que foram identificadas como falsos positivos utilizando o critério mencionado acima, em pelo menos dois dos três mAbs, ou seja, mAb12 Trp HC109, mAb7 TRP HC33, estas moléculas tenderam a ter dois Trps em um único domínio Fv que são quase que igualmente expostos ao solvente. A questão desperta se experimentalmente a probabilidade estatística de oxidação de dois Trps expostos em um único Fv é baixa em comparação com um sítio Trp único em vários domínios Fv (e conseqüentemente mAbs), o que resultaria em apenas uma Trp sendo preferencialmente oxidado quando exposto a um oxidante, mesmo quando a exposição ao solvente é similar. Se fosse verdade, isso poderia ter sido uma das causas potenciais para a obtenção de falsos positivos identificados com base na acessibilidade ao solvente. Globalmente, conclui-se que a média temporal da SASA de Trp na cadeia lateral foi suficiente para ser capaz de diferenciar entre resíduos Trp lábeis e os não lábeis; e quando dois Trps com suficiente acessibilidade ao solvente estiverem presentes no domínio Fv único, tal critério deve ser usado com cautela.

[0296] Para a isomerização de Asp, múltiplas variáveis relacionadas com resíduos Asp potencialmente lábeis foram geradas a partir de trajetórias de MD. Consistente com o mecanismo de isomerização do Asp (vide, por exemplo, Wakankar, A.A. *et al. Aspartate isomerization in the complementarity determining regions of two closely related monoclonal antibodies. Biochemistry* 46, 1534-1544 (2007)) (ataque nucleofílico da carbonila do Asp pelo nitrogênio da ligação peptídica N-terminal do resíduo N+1), as seguintes propriedades foram examinadas: (1) média temporal SASA para todos os resíduos Asp (SASA\_Asp), o átomo N da cadeia principal do resíduo N+1 (SASA (n+1), N), e átomo H do resíduo N+1 (SASA (N+1), H) de resíduos Asp; (2) informação mútua intraresíduo (MI) para resíduos Asp; (3)

entropia de Shannon para distribuições  $\phi$ - $\psi$ ; e (4) flutuações da média da raiz quadrática (RMSF) para átomos C $\alpha$ . Diversos Fabs que continham resíduos Asp, tanto lábil quanto estável, foram escolhidos para cálculos de MD. Motivos que já demonstravam previamente isomerizar em escalas de tempo que impactam a validade (vida útil) foram focados em (DG, DS, DT, DD, DA) (vide, por exemplo, Radkiewicz, J.L., Zipse, H., Clarke, S. & Houk, K.N. *Neighboring Side Chain Effects on Asparaginy and Aspartyl Degradation: An Ab Initio Study of the Relationship between Peptide Conformation and Backbone NH Acidity*. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3499-3506 (2001); Yi, L. *et al.* *Isomerization of Asp-Asp motif in model peptides and a Monoclonal Antibody Fab Fragment*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102, 947-959) e os Asps restantes foram excluídos.

[0297] Um conjunto de dados experimental foi compilado onde todos os mAbs foram formulados em condições semelhantes (pH 5,5), e submetidos ao estresse térmico (40 °C) e análise do mapa de peptídeos para calcular as taxas de degradação de resíduos Asp. A Fig. 6 mostra os resultados experimentais bem como as propriedades determinadas a partir das simulações por MD. Todos os resíduos Asp potencialmente lábeis são incluídos na Fig. 6, com a exceção dos resíduos Asp não pertencentes à CDR (resíduos estruturais) que só foram listados para uma única proteína, pois a repetição destes resíduos Asp não CDR seria redundante.

[0298] A análise de dados foi dupla. Em primeiro lugar, resíduos lábeis ( $\geq 2,5\%$ /semana) foram separados a partir dos resíduos estáveis ( $< 2,5\%$ /semana) e o valor médio de cada uma das propriedades foi comparado entre os dois grupos de resíduos Asp (Fig. 14). Esta etapa capacitou a identificação de quais propriedades mostraram diferenças substanciais entre os dois grupos. Conforme mostrado pelos valores-p entre as seis propriedades testadas, quatro propriedades, ou seja, SASA\_Asp, RMSF, SASA (n+ 1, N) e (n+1, H), exibiram diferenças significativas (IC 80%) entre os dois grupos de

resíduos Asp. Uma vez que nenhuma destas quatro propriedades sobre suas taxas de isomerização Asp previstas, uma análise multivariada foi utilizada em seguida. A correlação direta não pôde ser estabelecida usando ferramentas de regressão multivariada de componentes principais ou regressão dos mínimos quadrados parciais. A questão foi, portanto, perguntado se uma correlação binária pôde ser estabelecida, ou seja, se sítios com taxas  $\geq 2,5\%$ /semana a partir daqueles com  $< 2,5\%$ /semana podem ser diferenciados. Para isso, um valor de 1 foi atribuído a taxas  $> 2,5\%$ /semana e um valor de 0 para as taxas  $< 2,5\%$ /semana (Fig. 6). A regressão logística foi então realizada utilizando SASA\_Asp, RMSF, SASA (n+1, N) como variáveis independentes e a taxa binária de saída como variável dependente. O parâmetro SASA (n+1, H) foi excluído, uma vez que não proporciona um benefício adicional na análise de regressão. A equação como um resultado desta regressão é mostrada abaixo:

$$Y1 = 1 / (1 + \exp(-(-22,2+0,13*SASA\_ASP+3,3*RMSF +16,0*SASA(n+1,N))))$$

Eq. 4

[0299] O resultado desta equação foi arredondado para um algarismo significativo para proporcionar um resultado de 0 (não reativo) ou 1 (reativo) e é mostrado na Fig. 6.

[0300] A regressão logística fez corretamente a predição de 5/6 sítios lábeis e todos 9/9 sítios não reativos. Essencialmente, a equação gerada através de modelo logístico permite que se utilize os três parâmetros (SASA\_Asp, RMSF e SASA (n+1, N)), para prever a susceptibilidade de degradação de um resíduo Asp a uma taxa superior a 2,5%/semana nas condições experimentais testadas.

[0301] A validade do modelo foi testada usando a abordagem LOOCV. Deixando um mAb de fora e usando os mAbs restantes como um conjunto de treinamento para a análise de regressão logística, 5/6 sítios lábeis e 7/9 sítios não reativos foram previstos (Figura 6). Embora o resultado de

predição correta foi um pouco reduzido, ele ainda previu corretamente um total de 12/15 sítios (80%) e, portanto, foi satisfatório. A redução da percentagem sítios corretamente previstos utilizando os pontos de aproximação LOOCV para a probabilidade de mAbs específicos do conjunto de treinamento original pode contribuir desproporcionalmente para a manutenção de um resultado de predição altamente correto. Note que, enquanto esta abordagem de modelação pode ser específica para um determinado conjunto de condições experimentais, a abordagem de base provavelmente pode ser estendida a qualquer conjunto de condições experimentais, contanto que as taxas experimentais sejam conhecidas para um conjunto de resíduos Asp.

[0302] A Fig. 18 mostra um aparelho ilustrativo (1800). O aparelho (1800) pode ser uma máquina de computação. O aparelho (1800) pode incluir módulo de *chip* (1802), que pode incluir um ou mais circuitos integrados, o qual pode incluir uma lógica configurada para, com base nas características físico-químicas calculadas a partir do anticorpo, por exemplo, determinar a aptidão do anticorpo: para a produção ou inclusão em um agente terapêutico; para selecionar um anticorpo entre os anticorpos candidatos para inclusão no agente terapêutico; para dar suporte à fabricação do agente terapêutico que compreende o anticorpo; ou para realizar quaisquer outras operações lógicas adequadas associadas à seleção de anticorpo *in silico*, ou para outras atividades relacionadas.

[0303] O Aparelho (1800) pode incluir um ou mais dos seguintes componentes: circuito I/O (1804), que pode incluir o dispositivo transmissor e dispositivo receptor e pode interagir com um cabo de fibra ótica, cabo coaxial, linhas telefônicas, dispositivos sem fios, hardware de camada física (PHY), um teclado/dispositivo de controle de exibição ou qualquer outra mídia ou dispositivo adequado; dispositivos periféricos (1806), que podem incluir temporizadores contadores, temporizadores em tempo real, geradores *power-*

*on reset* ou quaisquer outros dispositivos periféricos adequados; dispositivo de processamento lógico (1808), o qual pode calcular, a partir da informação estrutural do anticorpo, parâmetros estruturais do anticorpo; selecionar fatores de escalonamento correspondentes aos parâmetros estruturais do anticorpo; quantificar indicies correspondentes às características físico-químicas do anticorpo; quantificar resistências de fluxo de recipientes de fabricação e distribuição; e memória legível por máquina (1810).

[0304] A memória legível por máquina (1810) pode ser configurada para armazenar dados de estruturas legíveis por máquina: informações estruturais de anticorpos; fatores de escalonamento correspondentes aos parâmetros estruturais do anticorpo; e qualquer outra informação ou dados adequados.

[0305] Os componentes (1802), (1804), (1806), (1808) e (1810) podem ser acoplados em conjunto por um *bus* de sistema ou outras interligações (1812) e pode estar presente em uma ou mais placas de circuitos, tal como (1820). Em alguns exemplos de realização, os componentes podem estar integrados em um único *chip* baseado em silício.

[0306] Será compreendido que os componentes de *software*, incluindo programas e dados, podem, se desejado, serem implementados na forma ROM (memória somente de leitura), incluindo CD-ROMs, EPROMs e EEPROMs, ou podem ser armazenadas em qualquer outro meio legível por computador adequado, tal como, mas não se limitando a; discos de diversos tipos, cartões e RAMs de diferentes tipos. Os componentes aqui descritos como *software* podem, alternativamente e/ou adicionalmente, ser implementados total ou parcialmente no *hardware*, se desejado, utilizando técnicas convencionais.

[0307] Diversos sinais representando a informação descrita no presente podem ser transferidos entre uma origem e um destino na forma de

ondas eletromagnéticas que viajam através de meios de condução de sinal, tais como fios metálicos, fibras óticas e/ou meios de transmissão sem fios (por exemplo, ar e/ou espaço).

[0308] O aparelho (1800) pode operar em um ambiente de rede com suporte a conexões para um ou mais computadores remotos através de uma rede de área local (LAN), uma rede de área ampla (WAN), ou outras redes adequadas. Quando utilizado em um ambiente de rede LAN, o aparelho (1800) pode ser conectado à rede LAN através de uma interface de rede ou adaptador no circuito I/O (1804). Quando utilizado em um ambiente de rede WAN, o aparelho (1800) pode incluir um modem ou outros meios para estabelecer comunicações através da WAN. Será compreendido que as ligações de rede mostradas são ilustrativas e que outros meios que estabeleçam uma ligação de comunicação entre os computadores poderão ser utilizados. A existência de qualquer um de vários protocolos conhecidos tais como TCP/IP, Ethernet, FTP, HTTP e similares é presumida, e o sistema pode ser operado em uma configuração cliente-servidor para permitir que um utilizador opere o dispositivo de processamento lógico (1808), por exemplo, através da Internet.

[0309] O aparelho (1800) pode ser incluído em diversos ambientes ou configurações de sistema de computação com finalidade geral ou finalidade especial. Exemplos de sistemas de computação, ambientes, e/ou configurações bem conhecidos que podem ser adequados para utilização com a invenção incluem, mas não se limitam a, computadores pessoais, computadores servidores, dispositivos manuais ou portáteis, telefones celulares e/ou outros assistentes pessoais digitais (PDAs), sistemas com múltiplos processadores, sistemas baseados em microprocessadores, *tablets*, eletrônicos de consumo programáveis, rede de computadores pessoais, minicomputadores, computadores *mainframe*, ambientes de computação distribuída que incluem qualquer um dos sistemas ou dispositivos acima, e

similares.

[0310] As Figs. 19A e 19B mostram processos ilustrativos (1900), para proporcionar a seleção de anticorpos *in silico* de acordo com os princípios da invenção. Por uma questão de ilustração, as etapas dos processos ilustrados serão descritas como sendo realizadas por um “sistema”. O “sistema” pode incluir uma ou mais das características do aparelho mostradas na Fig. 18 e/ou qualquer outro dispositivo adequado, tal como a máquina de computação ou abordagem. O “sistema” pode ser fornecido pela entidade que implementa a seleção de anticorpos *in silico* ou por qualquer outro indivíduo, organização ou modalidade adequado.

[0311] Nas Figs. 19A e 19B, setas sólidas indicam o fluxo de controle de processo e fluxo de informações. As setas tracejadas indicam o fluxo de informações.

[0312] A ordem de desempenho e/ou a descrição das etapas dos processos nas Fig. 19A e 19B, são meramente ilustrativas. Cada uma das etapas descritas não necessita ser completada na ordem ilustrada ou ao todo. Processos (1900) podem incluir etapas que não estão mostradas.

[0313] Processos (1900) podem ser concretizados como um algoritmo. O algoritmo pode incluir algumas ou todas as etapas de processos (1900).

[0314] Processos (1900) podem começar na etapa (1920) (mostrada na Fig. 19A). Na etapa (1920), o sistema pode receber um conjunto de dados. A informação (1922) pode incluir alguns ou todos os dados recebidos na etapa (1920).

[0315] A informação (1922) pode incluir informações relativas ao anticorpo (Ab) (1926) em condições de solução (1924). O sistema pode executar processos (1900) para analisar Ab (1926) sob condições (1924) para satisfação de critério de design (DC) (1958).

[0316] O Ab (1926) pode ser Ab da subclasse/classe (1948). A subclasse/classe de Ab (1948) pode ser uma classe de anticorpo tal como IgA ou IgE. A subclasse/classe de Ab (1948) pode ser uma subclasse de anticorpo, tal como IgA<sub>1</sub>. A subclasse/classe de Ab (1948) pode ser uma subclasse de anticorpo, tal como IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>4</sub>. A subclasse/classe de Ab (1948) pode ser qualquer classe, subclasse ou variedade de anticorpo.

[0317] O Ab (1926) pode ter uma estrutura. A estrutura do Ab (1926) pode ser representada pela estrutura de Ab (1950). A estrutura de Ab (1950) pode ser um código digital que corresponde à estrutura do Ab (1926).

[0318] A estrutura de Ab (1950) pode incluir informação sobre a sequência de aminoácidos do anticorpo (1926). A sequência (1952) pode ser um código digital que corresponde à sequência de Ab (1926). Sequência (1952) pode representar a estrutura primária.

[0319] A sequência (1952) pode incluir a sequência (1954) completa do Ab (1926). A sequência completa (1954) pode conter informações de sequência de todos os setores, domínios, regiões e/ou características do Ab (1926), incluindo HC cadeia pesada, LC cadeia leve, domínio variável Fv, domínio constante Fc, qualquer ou todas as regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2, etc., e qualquer outra característica estrutural do Ab (1926).

[0320] A sequência (1952) pode incluir a sequência cortada (1956) do Ab (1926). A sequência cortada (1952) pode ser menos completa do que a sequência completa (1954). A sequência cortada (1956) pode ser uma sequência parcial do Ab (1926). A sequência cortada (1956) pode conter informações de sequência de todos os setores, domínios, regiões e/ou características do Ab (1926), incluindo HC cadeia pesada, LC cadeia leve, domínio variável Fv, domínio constante Fc, qualquer ou todas as regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2, etc., e/ou qualquer outra

característica estrutural do Ab (1926).

[0321] A informação (1922) pode incluir informações relativas às condições (1924). As condições (1924) podem incluir informações relativas à solução tampão + sal (BSS) (1930). O BSS (1930) pode ser um código digital que corresponde a algumas das condições da solução que contém Ab (1926). Condições da solução podem incluir um ou mais dos seguintes: temperatura (T) (1932); composição química (1934) da solução tampão+sal, que pode incluir a identificação das espécies químicas da solução tampão+sal, que pode ou não pode conter sal diferente do que aquele presente no tampão; e concentrações (1936) de espécies químicas que podem estar presentes na solução. Concentrações (1936) podem incluir informação referente a um ou mais dos seguintes: concentração do tampão (1938); concentração de sal (1940); concentração de Ab (1942); pH (1944); e força iônica (IS) (1946).

[0322] A BSS (1930) pode representar uma solução virtual. A solução virtual pode ser associada com simulações MD. A BSS (1930) pode representar uma solução real. O ab (1926) pode representar um anticorpo virtual. A anticorpo virtual pode ser associado com simulações MD. O anticorpo virtual pode basear-se em um anticorpo real, diferenciando-o do anticorpo real por uma variação hipotética de sequência. O Ab (1926) pode representar um anticorpo real.

[0323] A informação (1922) pode incluir informações relativas à característica físico-química (PC) (1928). A PC (1928) pode incluir uma ou mais características físico-químicas, tais como viscosidade, depuração, estabilidade, labilidade do ácido aspártico e labilidade do triptofano. A PC (128) pode incluir qualquer outra característica físico-química de uma solução de Ab ou um Ab, tal como cor ou ponto isoelétrico. A PC 128 pode desempenhar um papel na determinação do DC (1958). Por exemplo, se a PC (128) é a viscosidade, o DC (1958) pode estar relacionado com a viscosidade; o DC (1958) pode incluir, por

exemplo, um limite de viscosidade.

[0324] A informação (1922) pode incluir a saída BSS (1931). A saída BSS (1931) pode incluir informações relativas às condições (1924). A saída BSS (1931) pode incluir informações relativas à BSS (1930).

[0325] A informação (1922) pode incluir a saída Ab (1927). A saída Ab (1927) pode incluir informações relativas ao Ab (1926).

[0326] A informação (1922) pode incluir a saída PC (1929). A saída PC (1929) pode incluir informações relativas à PC (1928).

[0327] A informação (1922) pode incluir a saída DC (1959). A saída DC (1959) pode incluir informações relativas ao DC (1958).

[0328] O sistema pode proceder a partir da etapa (1920) para a etapa (1960). Na etapa (1960), o sistema pode selecionar uma função objetiva. A função objetiva pode incluir fatores de escalonamento ( $sf$ ) e parâmetros ( $P$ ). Parâmetros  $P$  podem incluir uma ou mais propriedades relacionadas com a estrutura, tais como carga, assimetria de carga e hidrofobicidade. Parâmetros  $P$  podem incluir qualquer outra propriedade relacionada com a estrutura, tais como o momento magnético e momento de dipolo. O sistema pode multiplicar um parâmetro  $P_i$  por um fator de escalonamento  $sf_i$ . O produto multiplicativo  $sf_i P_i$  pode ser um termo na função objetiva.

[0329] O sistema pode selecionar a função objetiva, com base em informações a partir da saída PC (1929). A informação a partir da saída PC (1929) pode incluir informações relativas à PC (1928). A informação relativa à PC (1928) pode ser utilizada na escolha da função objetiva. Por exemplo, se a PC (1928) é viscosidade, o sistema pode selecionar uma função objetiva que, ao ser avaliada para o Ab (1926) sob as condições (1924), pode dar origem a um índice correspondente à viscosidade do Ab (1926) em BSS (1930). A forma matemática da função objetiva pode relacionar termos  $sf_i P_i$  à PC (1928).

[0330] O sistema pode avançar para a etapa (1962). Na etapa

(1962) o sistema pode selecionar os parâmetros a serem incluídos na função objetiva. Os parâmetros podem incluir parâmetros  $P_1...P_n$ , em que  $n$  pode ser o número total de parâmetros incluídos na função objetiva. O sistema pode selecionar parâmetros  $P_1...P_n$ , com base em informações a partir da saída  $Ab$  (1927). A informação a partir da saída  $Ab$  (1927) pode incluir informações relativas ao  $Ab$  (1926). As informações relativas ao  $Ab$  (1926) podem ser usadas na seleção de parâmetros  $P_1...P_n$ . Por exemplo, se a função objetiva selecionada na etapa (1962) relaciona-se com os termos  $sf_iP_i$  de viscosidade, a seleção de parâmetros  $P_1...P_n$  pode depender da subclasse/classe (1948) de  $Ab$ . Se a subclasse/classe (1948) de  $Ab$  é  $IgG_4$ , o sistema pode incluir nos parâmetros de função objetiva relativos às propriedades de  $F_c$ ; Se a subclasse/classe (1948) de  $Ab$  é  $IgG_1$ , o sistema pode excluir dos parâmetros de função objetiva relativos às propriedades de  $F_c$ .

[0331] O sistema pode selecionar os parâmetros  $P_1...P_n$ , com base nas informações da saída BSS (1931). A informação a partir da saída BSS (1931) pode incluir informações relativas à BSS (1930). As informações relativas à BSS (1930) podem ser usadas na seleção de parâmetros  $P_1...P_n$ . A informação a partir da saída BSS (1931) pode incluir informações relativas à força iônica (IS) (1946). As informações relativas à IS (1946) podem ser usadas na seleção de parâmetros  $P_1...P_n$ . Por exemplo, se a função objetiva selecionada na etapa (1960) relaciona-se com os termos  $sf_iP_i$  de viscosidade, a seleção de parâmetros  $P_1...P_n$  pode depender da IS (1946). Se a IS (1946) é uma força iônica alta, o sistema pode incluir nos parâmetros da função objetiva relacionados com a hidrofobicidade; se a IS (1946) é uma força iônica baixa, o sistema pode excluir os parâmetros da função objetiva relacionados com hidrofobicidade.

[0332] O sistema pode avançar para a etapa (1964). Na etapa (1964), o sistema pode selecionar valores de  $sf$ . A seleção de valores  $sf$  pode

incluir, na etapa (1966), a identificação dos valores  $sf_1...sf_n$ . Cada valor,  $sf_1...sf_n$ , pode servir como um multiplicador de um dos parâmetros  $P_1...P_n$ , respectivamente. Na etapa (1966), a identificação dos valores  $sf_1...sf_n$  pode incluir a identificação de cada valor de fator de escalonamento na memória da máquina (1910) (mostrado na Fig. 19B).

[0333] A memória da máquina (1910) pode incluir uma ou mais das características de memória (1810) (mostradas na Fig. 18). A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento. A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento pela temperatura, como representado pela memória configurada pela temperatura ( $T_A$  a  $T_x$ ) (1911). A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento pela força iônica, como representado pela memória configurada pela força iônica ( $IS_\alpha$  a  $IS_\omega$ ) (1913). A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento pela subclasse/classe, como representado pela memória configurada pela subclasse da IgG ( $IgG_1$  a  $IgG_4$ ) (1915). A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento pela solução tampão + sal, conforme representado pela memória configurada pela solução tampão + sal ( $BSS_1$  a  $BSS_m$ ) (1916). A memória da máquina (1910) pode armazenar os valores de fator de escalonamento pelo pH, como representado pela memória configurada pelo pH ( $pH_l$  a  $pH_x$ ) (1917).

[0334] A memória da máquina (1910) pode armazenar dados, como os mostrados na configuração da memória da máquina (1919). A configuração (1919) pode representar uma vista da memória da máquina (1910) fornecida por uma ferramenta de visualização de dados, tal como um visor controlado pelo circuito entrada/saída (circuito I/O) (1804) (mostrado na Fig. 18). A configuração (1919) inclui uma variedade de valores fatores de escalonamento baseados nas características estruturais de Ab particulares (por

exemplo, sequência completa, Fv, Fc), para uma IgG<sub>1</sub> sob condições específicas (180 mg/mL de Ab a 25 °C, pH 5,5 e IS alta; em tampão 20 mM + 200 mM de arginina HCl, sendo cada valor aproximado).

[0335] O banco de dados (1905) pode armazenar os valores de PC de anticorpos mensurados de diversas subclasses/classes sob diversas condições. O sistema pode analisar os valores PC mensurados para obter os fatores de escalonamento. O sistema pode armazenar os valores do fator de escalonamento na memória da máquina (1910).

[0336] Na etapa (1964), o sistema pode selecionar valores  $sf_1...sf_n$  com base em informações da saída BSS (1931). A informação a partir da saída BSS (1931) podem incluir T (1932), composição (1934) e concentrações (1936). T (1932), composição (1934) e/ou concentrações (1936) podem ser utilizados na seleção de valores  $sf_1...sf_n$ . Por exemplo, para um conjunto de parâmetros  $P_1...P_n$  selecionado na etapa (1962) para uma função objetiva selecionada na etapa (1960), os valores  $sf_1...sf_n$  pode depender de T (1932); assim, enquanto um conjunto de valores  $sf_1...sf_n$  pode ser selecionado para uma solução a 25 °C, um conjunto diferente de valores  $sf_1...sf_n$  pode ser selecionado para uma segunda solução que difere da primeira solução apenas pelo fato de que a segunda solução está a 35 °C. Os dois conjuntos de valores  $sf_1...sf_n$  para as duas soluções diferindo apenas pela temperatura podem estar localizados em dois locais distintos na memória da máquina (1910).

[0337] O sistema pode selecionar parâmetros  $sf_1...sf_n$ , com base em informações a partir da saída Ab (1927). A informação da saída Ab (1927) pode ser utilizada na etapa (1964).

[0338] A informação a partir da saída Ab (1927) pode incluir a estrutura do Ab (1950). A estrutura (1950) do Ab pode ser utilizada na seleção dos valores  $sf_1...sf_n$ . Por exemplo, para um conjunto de parâmetros  $P_1...P_n$  selecionado na etapa (1962) para uma função objetiva selecionada na etapa

(1960), os valores  $sf_1...sf_n$  podem depender da sequência (1952); enquanto que um conjunto de valores  $sf_1...sf_n$  pode ser selecionado para um anticorpo com a sequência completa (1954), um conjunto diferente de valores  $sf_1...sf_n$  pode ser selecionado para o mesmo anticorpo com a sequência cortada (1956). Os dois conjuntos de valores  $sf_1...sf_n$  para o mesmo anticorpo com duas sequências diferentes (1952) podem estar localizados em dois locais distintos na memória da máquina (1910).

[0339] Na etapa (1966), as localizações dos fatores de escalonamento na memória da máquina (1910) podem ser identificadas de acordo com a informação da saída BSS (1931) e/ou saída Ab (1927).

[0340] Na etapa (1968), o sistema pode recuperar valores  $sf_1...sf_n$ . Valores  $sf_1...sf_n$  podem ser recuperados a partir de locais da memória da máquina identificados na etapa (1966).

[0341] O sistema pode avançar para a etapa (1970). Na etapa (1970), o sistema pode calcular valores  $P_1'...P_n'$  para parâmetros  $P_1...P_n$ , respectivamente. Os valores  $P_1'...P_n'$  podem ser calculados com base em informações a partir da saída Ab (1927). A informação a partir da saída Ab (1927) pode ser utilizada na etapa (1970). Os valores  $P_1'...P_n'$  podem ser calculados com base em informações a partir da saída BSS (1931). A informação a partir da saída BSS (1931) pode ser utilizada na etapa (1970).

[0342] O sistema pode avançar para a etapa (1972). Na etapa (1972), o sistema pode avaliar a função objetiva. Um valor da função objetiva pode ser calculado com base nos valores  $sf_1...sf_n$  e valores  $P_1'...P_n'$ . O valor calculado para a função objetiva pode corresponder a uma predição do valor PC (1928) para Ab (1926) sob as condições (1924).

[0343] O sistema pode avançar para a etapa (1974). Informações da saída DC (1959) pertencendo a DC (1958) podem ser utilizadas na etapa (1974). Na etapa (1974), o sistema pode comparar a predição do valor de PC

(1928) com DC (1958), para determinar se o Ab (1926) sob condições (1924) satisfaz o DC (1958).

[0344] Se o DC (1958) é satisfeito, o sistema pode avançar para a etapa (1976). Na etapa (1976), a produção de anticorpo pode ser realizada. A produção do Ab pode incluir a transferência fluida de Ab (1926). A produção do Ab pode incluir o armazenamento de Ab (1926). A produção do Ab pode incluir a fabricação de Ab (1926). A fabricação de Ab (1926) pode incluir a modificação de um anticorpo virtual (1926) em um anticorpo real. A produção de Ab pode incluir qualquer etapa e atividade associada com a produção de um anticorpo.

[0345] O sistema pode avançar para a etapa (1978) a partir da etapa (1976). O sistema pode avançar para a etapa (1978), se, na etapa (1974), o DC (1958) não foi satisfeito.

[0346] Na etapa (1978), o sistema pode consultar se um ou mais dados de saída BSS (1931), saída Ab (1927), saída PC (1929) e/ou saída DC (1959) deve ser redefinido. Por exemplo, enquanto que o DC (1958) pode ter sido satisfeito na etapa (1974) e o Ab (1926) pode estar atualmente em produção, na etapa (1976), pode ter surgido uma necessidade de: produzir o Ab (1926) em uma concentração de anticorpo diferente da concentração (1942) de Ab da produção atual; produzir o Ab (1926) em um tampão de composição química diferente da composição (1934) da produção atual; ou produzir um anticorpo diferente do Ab (1926) da produção atual.

[0347] Se a resposta à consulta da etapa (1978) for negativa, o sistema pode avançar até o fim (1980). O sistema pode não chegar ao final (1980) na ausência de uma resposta na etapa (1978), após decorrido algum tempo ou de acordo com algum outro critério.

[0348] Se a resposta à consulta da etapa (1978) for afirmativa, o sistema pode avançar até a etapa (1982). Na etapa (1982), a um dado ou mais

de um dado a partir dos dados de saída BSS (1931), saída Ab (1927), saída PC (1929) e saída DC (1958), pode(m) ser redefinido(s). Por exemplo, um dado ou mais do que um dado da sequência (1950) pode ser redefinido (através de, por exemplo: alteração de um único resíduo de aminoácido; mudando a sequência de completa a cortada; substituindo o Ab (1926) por um anticorpo substancialmente diferente na sequência a partir do Ab (1926)); ou um dado ou mais do que um dado de concentrações (1936) pode ser redefinido (através de, por exemplo: alteração do pH ou IS). Da mesma forma, podem ser feitas alterações nos dados relativos à subclasse/classe de Ab (1948), BSS (1930), PC (1928) e DC (1958).

[0349] O sistema pode voltar para a etapa (1920) a partir da etapa (1982). A redefinição de dados na etapa (1982) pode ser recebida na etapa (1920).

[0350] Um técnico hábil no assunto compreenderá que os elementos do aparelho, meios e código mostrados descritos na presente divulgação podem ser configurados de modo deferente das configurações citadas, e que um ou mais dos elementos citados podem ser opcionais. Um técnico hábil no assunto compreenderá que as etapas dos processos e métodos aqui apresentadas e descritas podem ser realizadas em uma ordem diferente da ordem citada e que uma ou mais etapas ilustradas podem ser opcionais.

[0351] Assim, foram fornecidos aparelhos, métodos e meios, incluindo o código em suporte eletrônico, para a realização de um ou mais dentre: a determinação, com base nas características físico-químicas do anticorpo calculadas, da aptidão do anticorpo para inclusão no agente terapêutico; a seleção do anticorpo, com base nas características físico-químicas do anticorpo calculadas, entre os anticorpos candidatos para a inclusão no agente terapêutico; e a fabricação do agente terapêutico com base

nas características físico-químicas do anticorpo calculadas. Os técnicos hábeis no assunto compreenderão que a presente invenção pode ser praticada por outras formas que vão além dos exemplos de realização descritos, que são apresentados com propósitos ilustrativos e de limitação. A presente invenção é definida pelas reivindicações a seguir.

### REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, mais precisamente uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo, caracterizado por ser realizado a partir de uma base de dados eletrônica e/ou com um dispositivo de computação, e por compreender:

(a) estabelecer um limite de viscosidade para o anticorpo;

(b) calcular, a partir da informação de uma estrutura primária de uma informação estrutural do anticorpo, uma carga líquida e uma assimetria de carga, em que a estrutura primária compreende: uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve (VL) e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada (VH);

(c) obter um primeiro fator de escalonamento que corresponde à carga líquida, e um segundo fator de escalonamento que corresponde à assimetria de carga, em que a obtenção de ditos fatores de escalonamento compreende selecionar dito primeiro fator de escalonamento e dito segundo fator de escalonamento a partir de um conjunto de fatores de escalonamento para cada uma ou mais das condições de solução aquosa;

(d) calcular um índice preditivo de uma viscosidade do anticorpo usando uma função objetiva que compreende os fatores de escalonamento, a carga líquida, e a assimetria de carga, em que dita função objetiva compreende uma soma da carga líquida multiplicada pelo primeiro fator de escalonamento e a assimetria de carga multiplicada pelo segundo fator de escalonamento; e

(e) se o índice preditivo for menor do que ou igual ao limite de viscosidade, determinar que o anticorpo é adequado para inclusão na composição farmacêutica.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo pH estar entre 4 e 9.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela carga líquida compreender uma soma de uma carga líquida da sequência de aminoácidos VL e de uma carga líquida da sequência de aminoácidos VH e pela assimetria de carga compreender um produto aritmético da carga líquida da sequência de aminoácidos VL e da carga líquida da sequência de aminoácidos VH.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, na função objetiva,  $\log_{10}$  do índice preditivo compreender a soma de (a carga líquida multiplicada pelo primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga multiplicada pelo segundo fator de escalonamento).

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda as etapas de:

(a) calcular, a partir da informação estrutural, a partir da informação de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo, uma hidrofobicidade; e

(b) obter um terceiro fator de escalonamento que corresponde à hidrofobicidade, em que a função objetiva compreende ainda o terceiro fator de escalonamento.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela hidrofobicidade compreender um total de funções somatórias de valores de hidrofobicidade da uma ou mais CDRs.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por cada uma das funções somatórias ser uma razão entre uma soma de valores de resíduos hidrofóbicos de uma CDR e uma soma de valores de resíduos hidrofílicos da CDR.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 7, caracterizado pelos valores serem valores de escala de hidrofobicidade de Eisenberg.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6, caracterizado pela uma ou mais CDRs compreender todas as seis CDRs.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela obtenção dos fatores de escalonamento compreender ainda obter o primeiro fator de escalonamento, o segundo fator de escalonamento e o terceiro fator de escalonamento a partir de um conjunto de fatores de escalonamento para cada uma ou mais condições de solução aquosa.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado por, na função objetiva,  $\log_{10}$  do índice preditivo compreender a soma de (a carga líquida multiplicada pelo primeiro fator de escalonamento) mais (a assimetria de carga multiplicada pelo segundo fator de escalonamento) mais (a hidrofobicidade multiplicada pelo terceiro fator de escalonamento).

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda, se o índice preditivo for menor do que ou igual ao limite de viscosidade, produzir o anticorpo.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo anticorpo ser um anticorpo IgG1.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo anticorpo ser produzido de acordo com um método de cultura, sob condições adequadas para expressão do anticorpo, em que uma célula hospedeira que compreende ácido nucleico codifica o anticorpo.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda, se o índice preditivo for menor do que ou igual ao limite de viscosidade, preparar a composição farmacêutica que compreende o

anticorpo.

<b>mAb</b>	<b><math>\eta</math>, IS alta 150 mg/mL</b>	<b><math>\eta</math>, IS alta 180 mg/mL</b>	<b>Fv q</b>	<b>Fv CAP</b>	<b>HI</b>
mAb1	7	12	7.9	14.5	0.78
mAb2	5	7.1	7.7	12.1	0.93
mAb3	7.4	13	6.1	8.4	0.92
mAb4	8	14	3.6	1.3	1.01
mAb5	8.4	15	1.5	-4.5	1.1
mAb6	11	20	3.9	3.8	1.19
mAb7	20	46	3.3	2.6	1.32
mAb8	12	22	4.5	0.9	0.99
mAb9	26	70	0.5	-7.5	1.44
mAb10	15	33	1.8	-6.5	0.93

**Figura 1A**

<b>mAb</b>	<b><math>\eta</math>, IS baixa 150 mg/mL</b>	<b>Fv q</b>	<b>Fv CAP</b>
mAb1'	3	6.5	9.46
mAb2'	5	7.7	12.1
mAb3'	5.6	7.9	14.5
mAb4'	8.5	3.6	1.28
mAb5'	10	3.9	3.8
mAb6'	20	3.3	2.6
mAb7'	35	1.5	-4.5
mAb8'	48	4.9	0.94
mAb9'	180	0.5	-7.5
mAb10'	250	1.8	-6.48

**Figura 1B**

mAbs	HI			HI			Soma HI, LC1, LC3		Carga FV, Depuração FV, pH 7.4 mL/kg/dia
	LC1	LC2	LC3	HC1	HC2	HC3	LC3	HC3	
mAb1	1.2	1.4	0.5	1.4	1.1	3.9	5.6	4.3	3.0
mAb2	1.3	4.0	1.6	14.3	0.8	0.9	3.4	-2.2	-3.0
mAb3	1.3	5.7	1.7	2.5	1.6	1.5	4.1	0.6	-1.0
mAb4	1.2	1.5	0.5	1.4	1.1	3.9	5.6	2.4	1.0
mAb5	0.8	0.3	1.9	2.3	0.6	0.6	3.0	6.5	2.1
mAb6	1.1	5.8	0.2	3.2	1.5	0.6	1.6	-2.3	-3.9
mAb7	1.0	0.2	0.6	6.1	0.5	1.7	3.9	8.1	4.1
mAb8	1.0	0.2	0.6	1.9	1.4	1.5	2.8	0.4	-0.9
mAb9	1.1	5.7	0.2	8.3	0.8	1.3	2.1	1.4	0.0
mAb10	0.8	0.3	0.1	3.5	1.4	1.0	1.8	1	-1.9
mAb11	0.9	5.7	0.2	1.2	0.7	1.2	2.1	6.1	4.1
mAb12	0.9	1.0	0.7	3.6	0.6	2.5	3.8	4.9	2.0
mAb13	1.1	1.6	0.5	3.3	1.3	1.1	2.3	5.7	3.00
Avg (SD) mAb 1-7	1.1 (0.2)	2.7 (2.4)	1.0 (0.7)	4.4 (4.6)	1.0 (0.4)	1.9 (1.5)	3.9 (1.4)		
Avg (SD) mAb 8-13	1.0 (0.1)	2.4 (2.6)	0.4 (0.3)	3.6 (2.5)	1.0 (0.4)	1.4 (0.6)	2.5 (0.7)		

Figura 2

Depuração	Carga	Valor da soma HI (LC CDR1, LC CDR3, HC CDR3)
Normal (<10 mL/kg/dia)	-2.0 - 6.2	> 4.0
Rápida (>=10 mL/kg/dia)	</= -2.0 or >/= 6.2	</= 4.0

Figura 3

mAb	Soma HI,	Carga Fv, pH 5.5	CI	Atribuição de Depuração Experimental	Atribuição de Depuração Prevista
mAb1	2.4	2.6	3	Normal	Normal
mAb2	2.2	4.3	3	Normal	Normal
mAb3	2.7	3.1	3	Normal	Normal
mAb4	4.0	0.4	4	Normal	Normal
mAb5	2.2	5.3	4	Normal	Normal
mAb6	1.2	3.3	4	Normal	Normal
mAb7	3.3	3.4	4	Normal	Normal
mAb8	2.8	5.6	4	Normal	Normal
mAb9	3.4	4.4	4	Normal	Normal
mAb10	2.6	0.6	4	Normal	Normal
mAb11	2.3	1.8	5	Normal	Normal
mAb12	2.8	5.1	5	Normal	Normal
mAb13	2.6	4.8	5	Normal	Normal
mAb14	3.6	4.5	5	Normal	Normal
mAb15	4.1	3.6	5	Normal	Rápida
mAb16	3.8	4.9	5	Normal	Normal
mAb17	3.6	7.7	5	Normal	Rápida
mAb18	4.3	3.2	6	Normal	Rápida
mAb19	3.5	3.9	6	Normal	Normal
mAb20	2.1	6.1	6	Normal	Normal
mAb21	1.8	1	6	Normal	Normal
mAb22	1.0	3.7	7	Normal	Normal
mAb23	2.1	1.4	7	Normal	Normal
mAb24	2.6	8.3	7	Normal	Rápida
mAb25	3.1	7	8	Normal	Rápida
mAb26	2.8	0.4	8	Normal	Normal
mAb27	3.7	3.3	8	Normal	Normal

Figura 4

mAb28	1.9	-1.5	9	Normal	Normal
mAb29	3.3	3.4	9	Normal	Normal
mAb30	5.5	1.4	10	Rápida	Rápida
mAb31	1.7	-2.5	10	Rápida	Rápida
mAb32	3.9	8.1	10	Rápida	Rápida
mAb33	3.1	10.6	11	Rápida	Rápida
mAb34	5.5	1.4	12	Rápida	Rápida
mAb35	3.2	0.4	13	Rápida	Normal
mAb36	4.0	6.3	14	Rápida	Rápida
mAb37	3.0	6.5	16	Rápida	Rápida
mAb38	2.1	8.1	17	Rápida	Rápida
mAb39	1.6	-2.3	20	Rápida	Rápida
mAb40	5.6	2.4	20	Rápida	Rápida
mAb41	1.6	8.1	22	Rápida	Rápida
mAb42	6.1	2.4	26	Rápida	Rápida
mAb43	4.1	0.6	54	Rápida	Rápida
mAb44	3.4	-2.2	55	Rápida	Rápida
mAb45	5.6	4.3	61	Rápida	Rápida

**Figura 4 (cont.)**

mAb	Cadeia	Resnum	SASA_cadeia		Oxidação AAPH	Hot Spot Experimental	Hot Spot Predito (>30% SASA)
			Lateral	% SASA			
mAb1	HC	33	83	31	97	Sim	Sim
mAb2	HC	100	133	50	94.8	Sim	Sim
mAb3	HC	107	60	23	90	Sim	Não
mAb4	HC	33	97	37	84	Sim	Sim
mAb5	HC	105	189	71	80	Sim	Sim
mAb6	HC	104	117	44	80	Sim	Sim
mAb7	HC	103	114	43	80	Sim	Sim
mAb8	HC	103	83	31	69	Sim	Sim
mAb9	HC	28	140	53	65	Sim	Sim
mAb3	HC	33	90	34	60	Sim	Sim
mAb10	HC	106	105	39	55	Sim	Sim
mAb11	HC	52	168	63	54	Sim	Sim
mAb12	LC	94	173	65	53	Sim	Sim
mAb13	HC	53	169	64	38	Sim	Sim
mAb14	HC	107	43	16	20	Não	Não
mAb15	LC	92	117	44	9.6	Não	Sim
mAb15	HC	33	91	34	8.6	Não	Sim
mAb16	LC	101	75	28	1.7	Não	Não
mAb14	LC	90	66	25	0.2	Não	Não
mAb10	LC	90	22	8	0.2	Não	Não
mAb12	HC	109	129	49	0	Não	Sim
mAb7	HC	33	113	43	0	Não	Sim
mAb17	HC	106	63	24	0	Não	Não
mAb13	HC	106	48	18	0	Não	Não
mAb18	HC	33	38	14	0	Não	Não
mAb6	HC	105	18	7	0	Não	Não
mAb7	HC	105	14	5	0	Não	Não
mAb8	LC	96	11	4	0	Não	Não
mAb11	LC	100	8	3	0	Não	Não
mAb17	HC	111	4	1	0	Não	Não
mAb18	LC	152	2	1	0	Não	Não
mAb19	HC	48	2	1	0	Não	Não
mAb20	HC	35	1	1	0	Não	Não
mAb21	HC	162	1	0	0	Não	Não
mAb22	LC	39	0	0	0	Não	Não
mAb8	HC	35	0	0	0	Não	Não
mAb22	HC	37	0	0	0	Não	Não
mAb13	LC	186	29	11	0	Não	Não

Figura 5

mAb	Asp	Resíduo Seq (N+1)	Taxa mesurada %/semana	SASA Asp (nm <sup>2</sup> )	RMSF Å	SASA (N+1, N) (nm <sup>2</sup> )	Entrada Binária Mensurada	Saída binária Prevista (todos)	Saída binária Prevista (LOOCV)
mAb 1	L30	DD	22	96	3.0	0.7	1	1	1
mAb 2	L32	DG	12	126	2.1	0.8	1	1	1
mAb 3	H102	DG	8	131	3.1	3.4	1	1	1
mAb 5	L30	DG	7	79	1.3	1.3	1	0	0
mAb 1	H62	DD	7	110	1.7	3.1	1	1	1
mAb 6	H105	DD	5	106	2.2	0.0	1	1	1
mAb 2	H55	DG	0	101	1.2	0.0	0	0	0
mAb 2	H73	DG	0	42	1.0	3.3	0	0	1
mAb 1	L31	DD	0	72	2.6	0.2	0	0	0
mAb 7	H106	DD	0	47	1.0	0.0	0	0	0
mAb 3	H62	DS	0	116	1.1	1.4	0	0	1
mAb 2	L34	DS	0	81	1.7	1.3	0	0	0
mAb 1	L92	DT	0	79	2.9	0.1	0	0	0
mAb 4	H31	DT	0	106	1.6	0.0	0	0	0
mAb 4	H90	DT	0	9	1.0	0.0	0	0	0

Figura 6

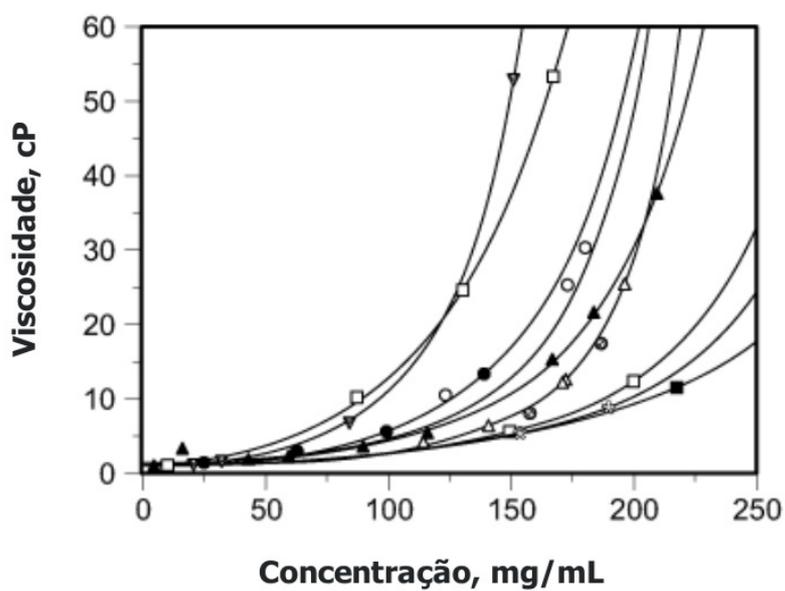


Figura 7

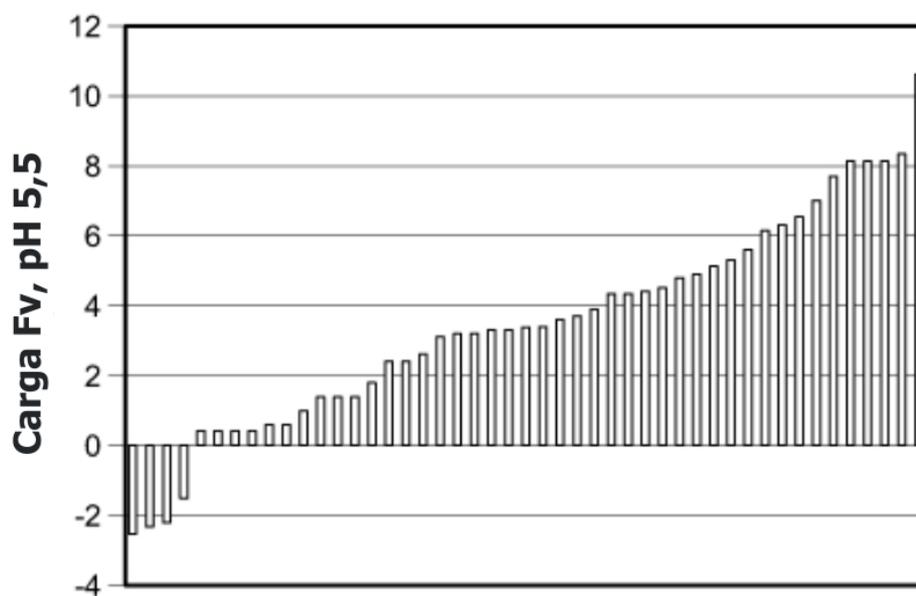


Figura 8A

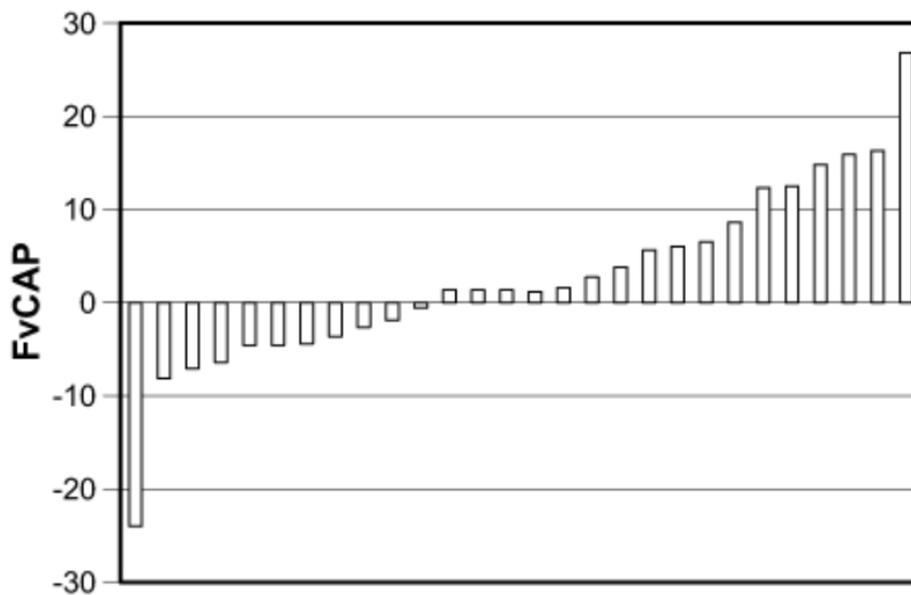
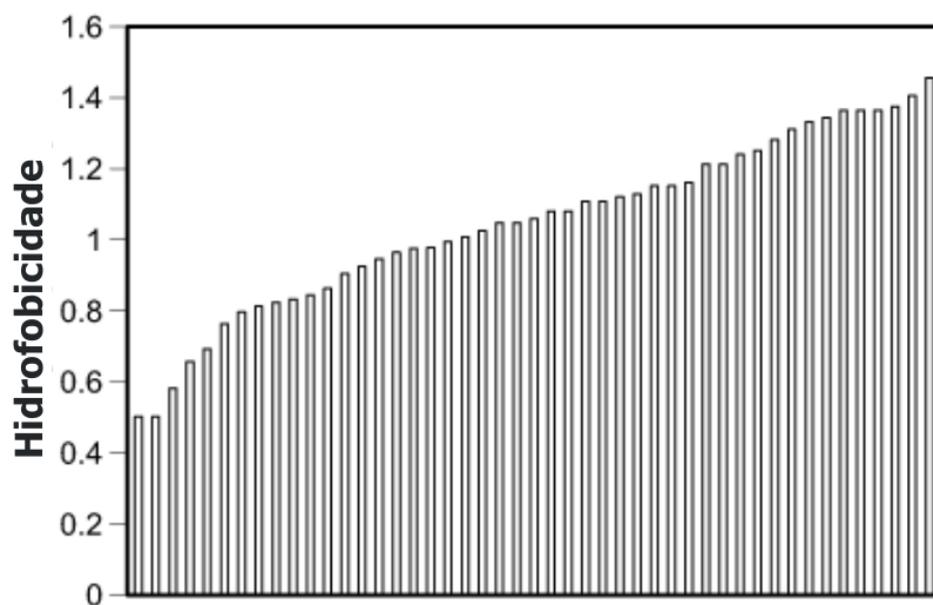


Figura 8B

*Figura 8C*

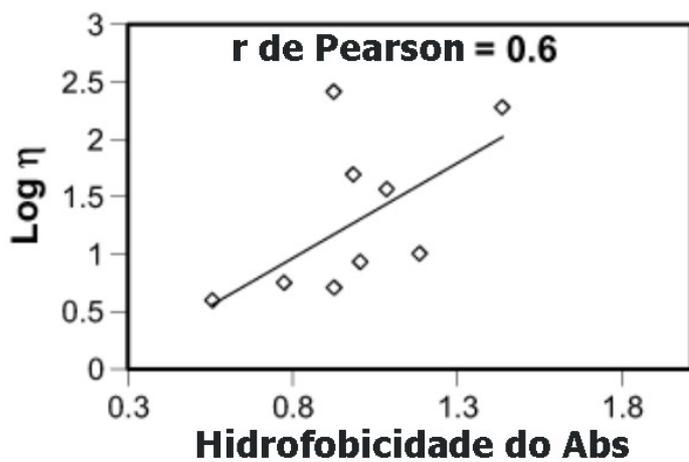


Figura 9A

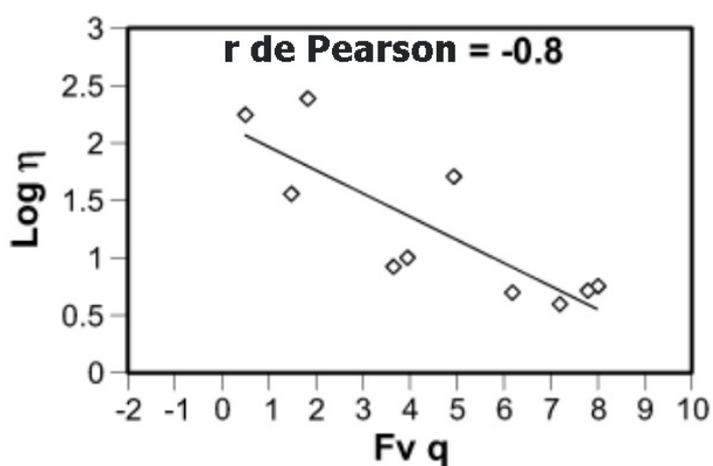


Figura 9B

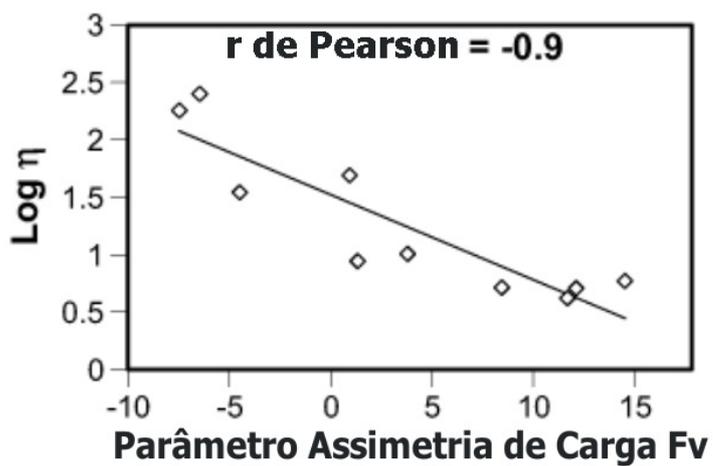


Figura 9C

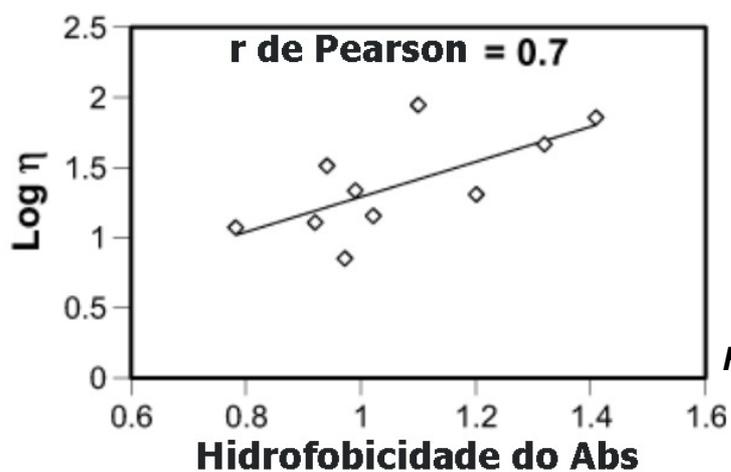


Figura 10A

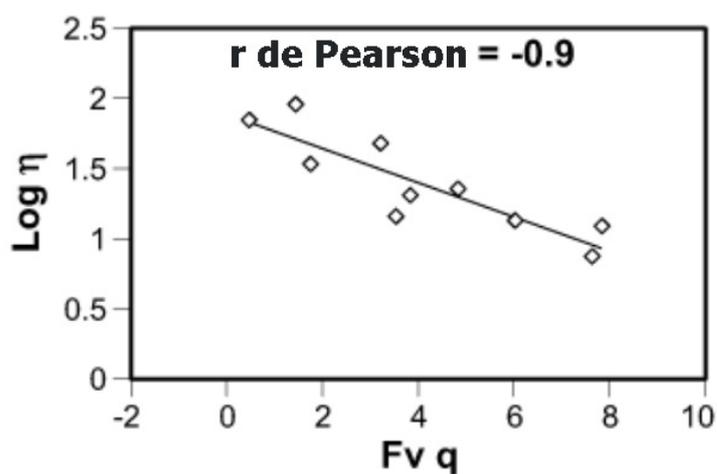


Figura 10B

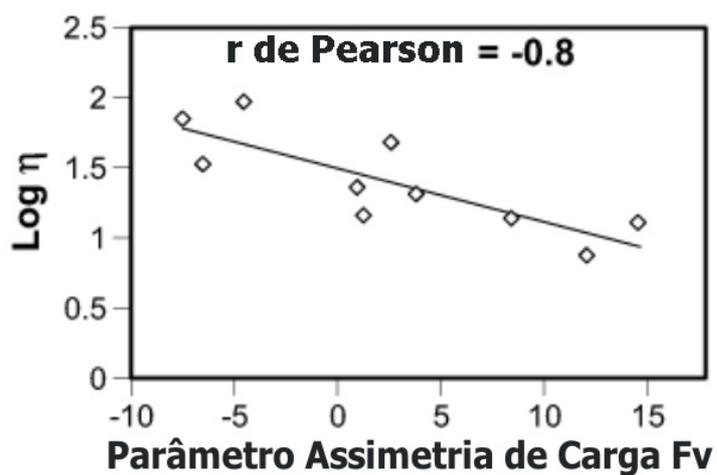
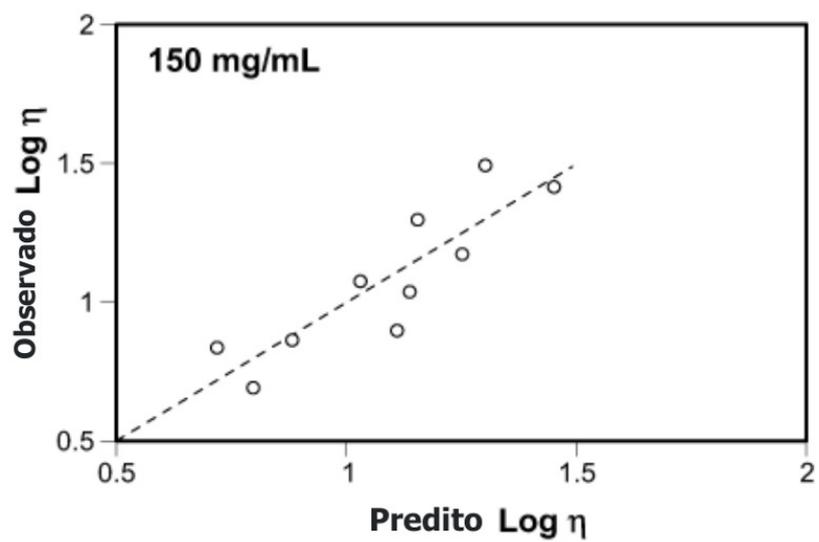
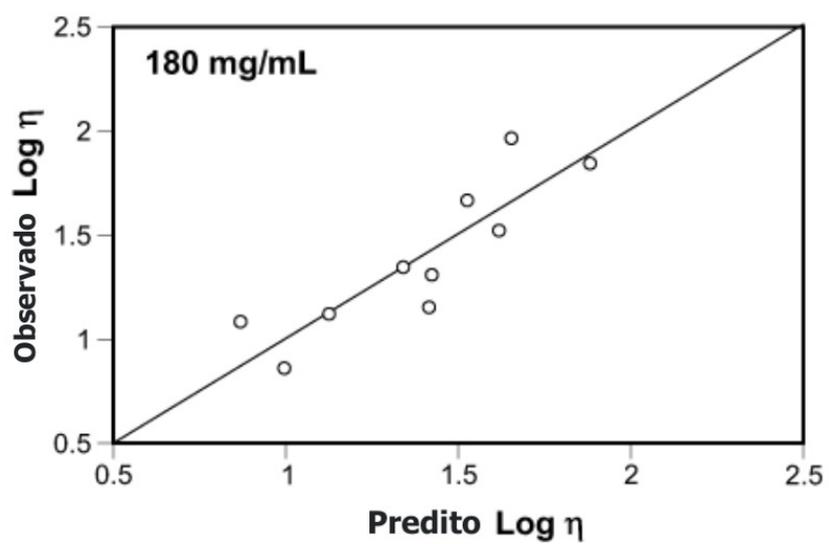
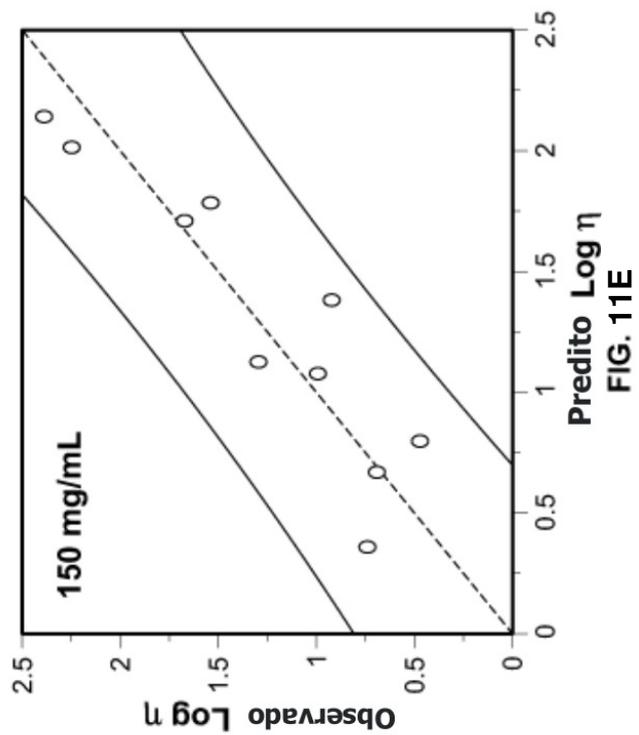
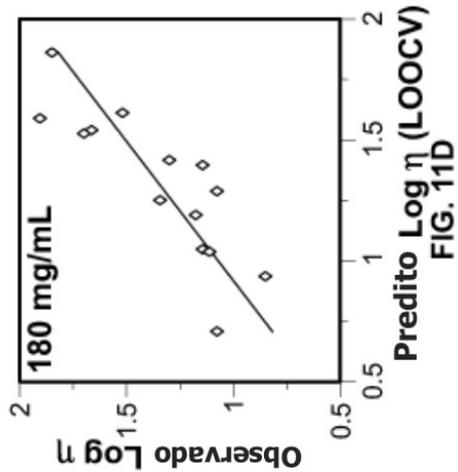
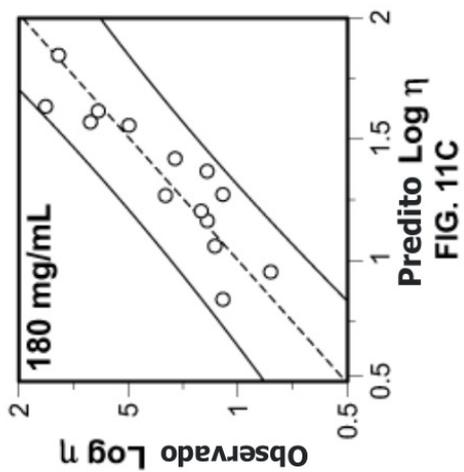
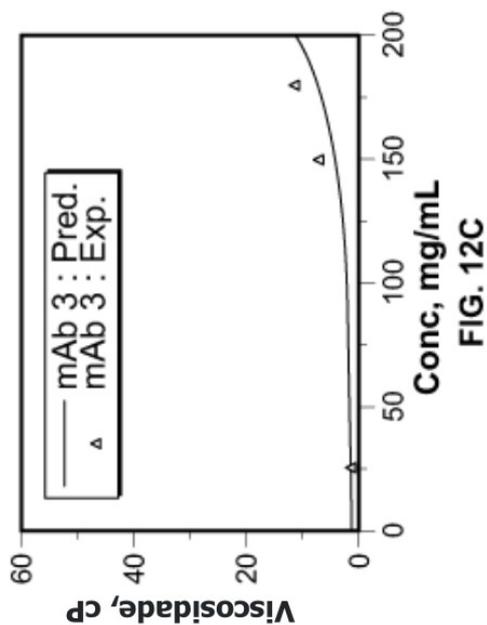
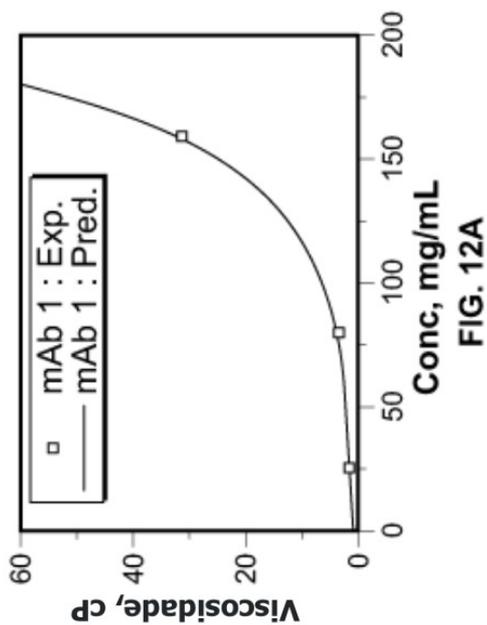
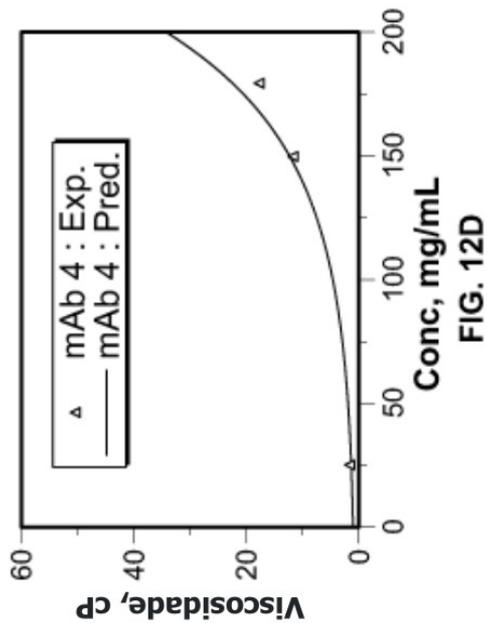
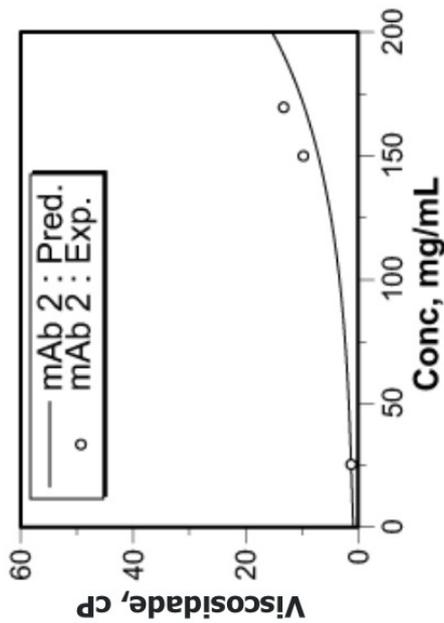
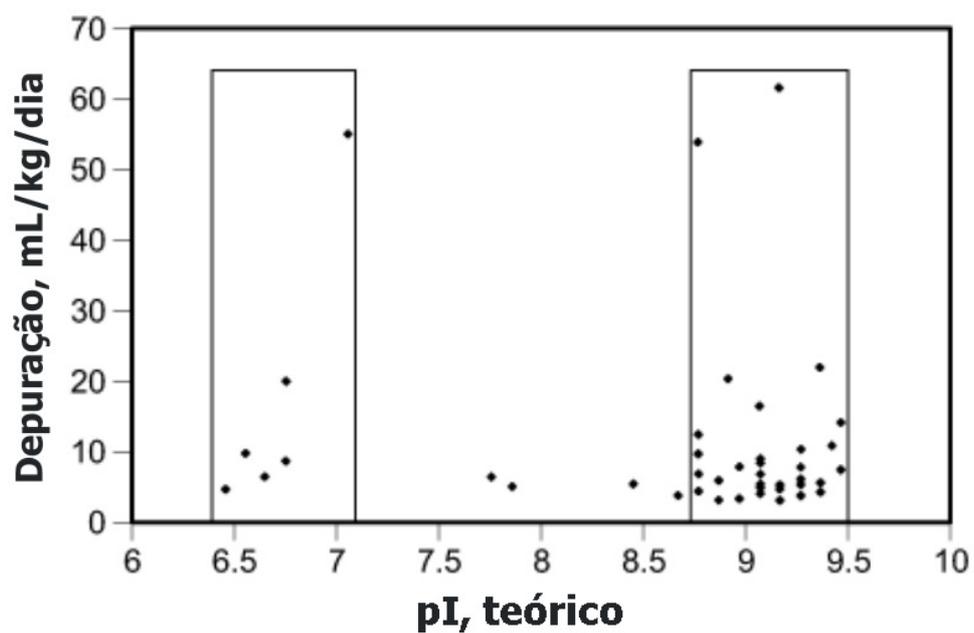
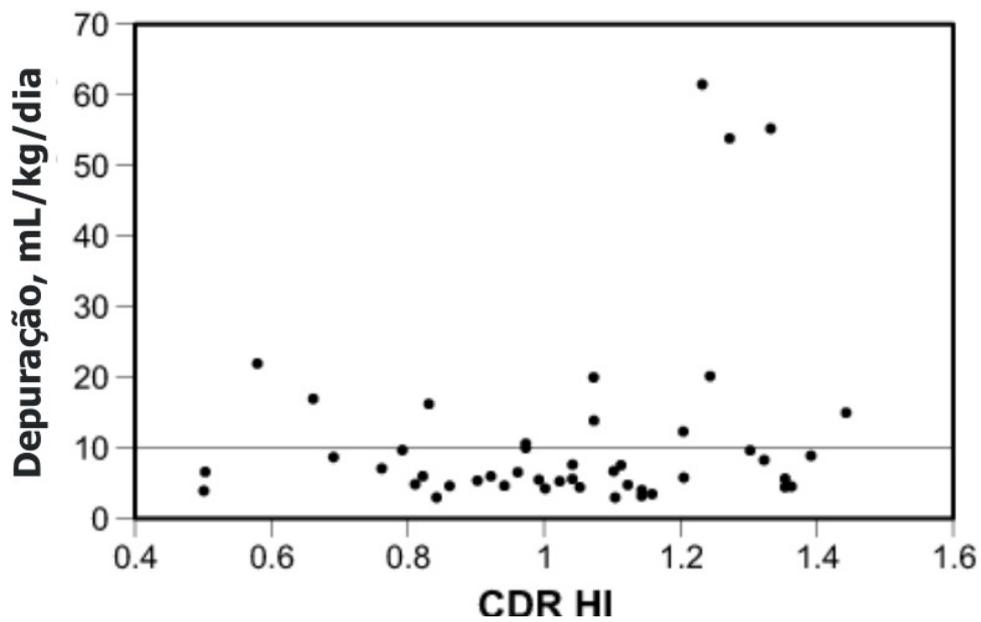


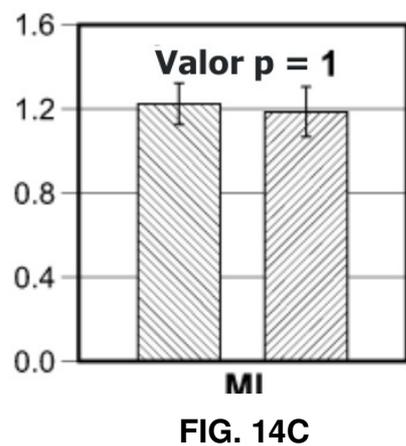
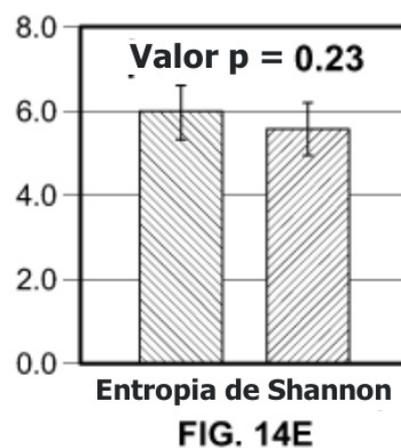
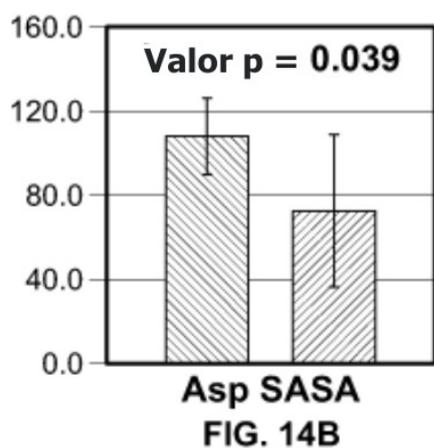
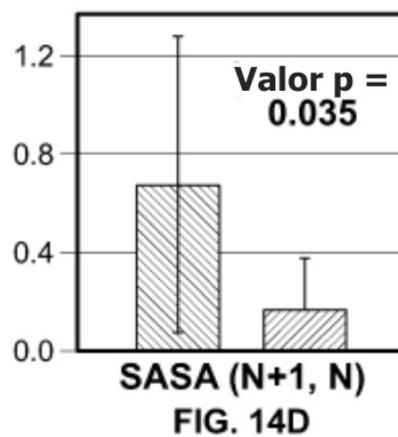
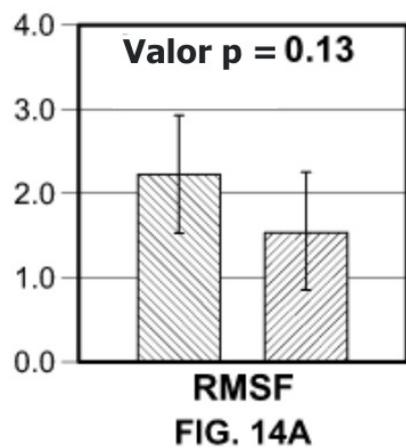
Figura 10C

*Figura 11A**Figura 11B*





*Figura 13A**Figura 13B*



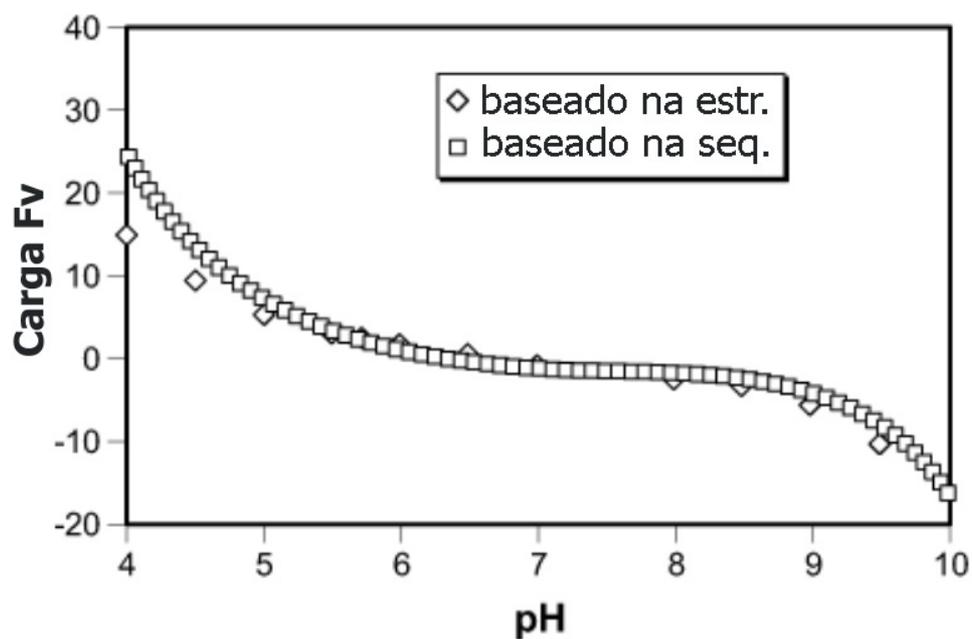


Figura 15A

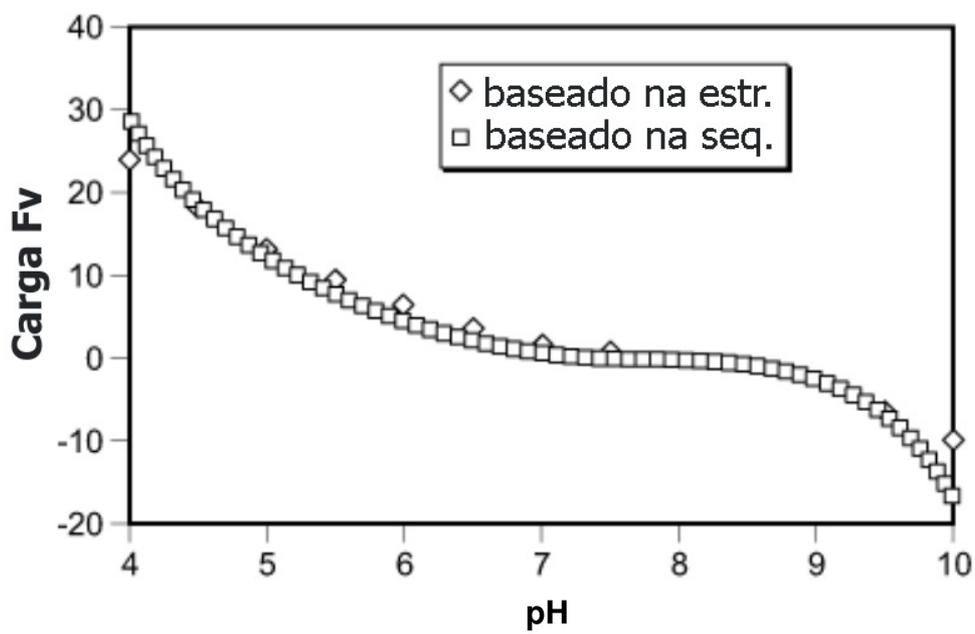


Figura 15B

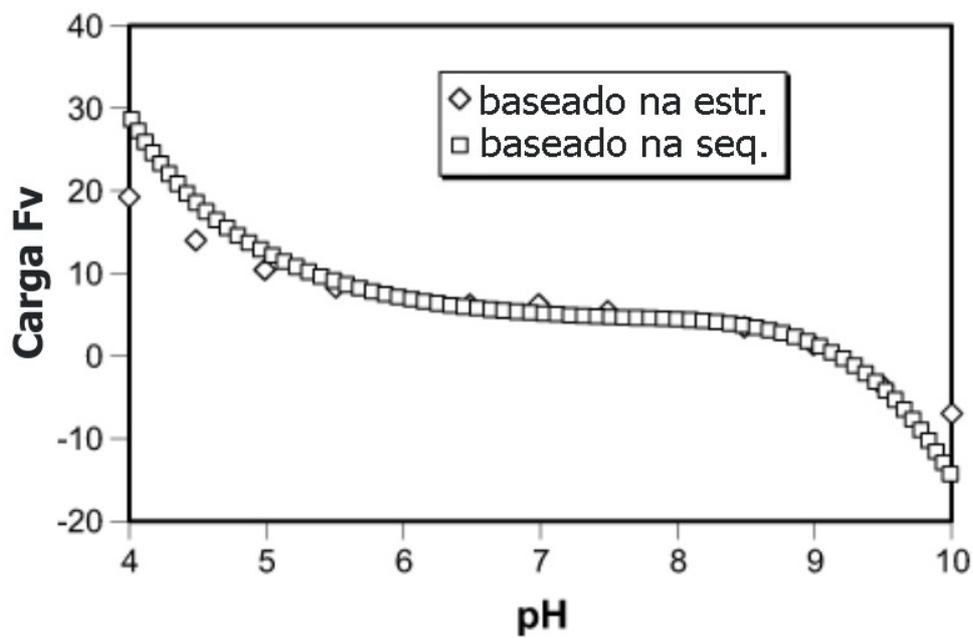


Figura 15C

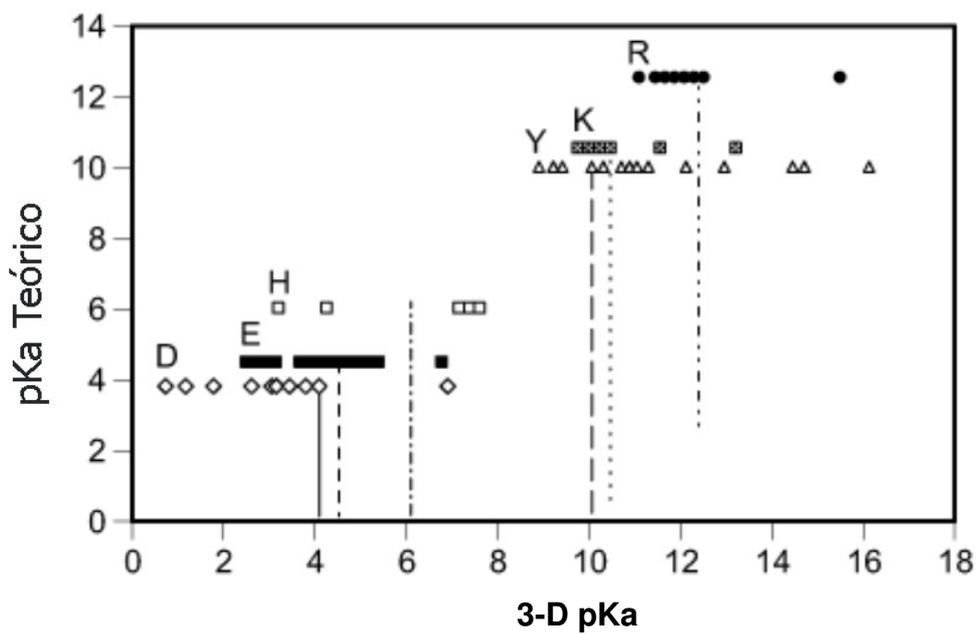
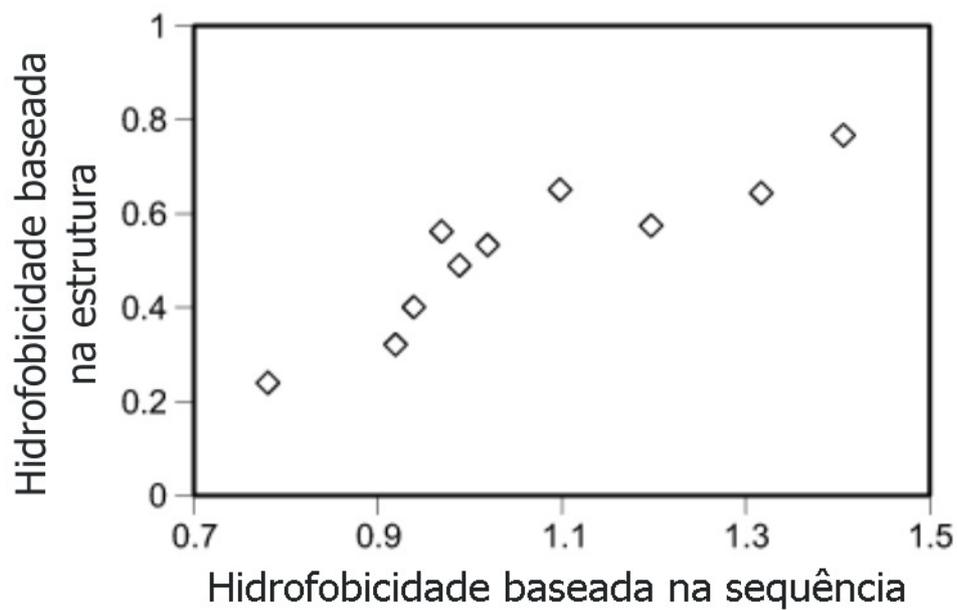
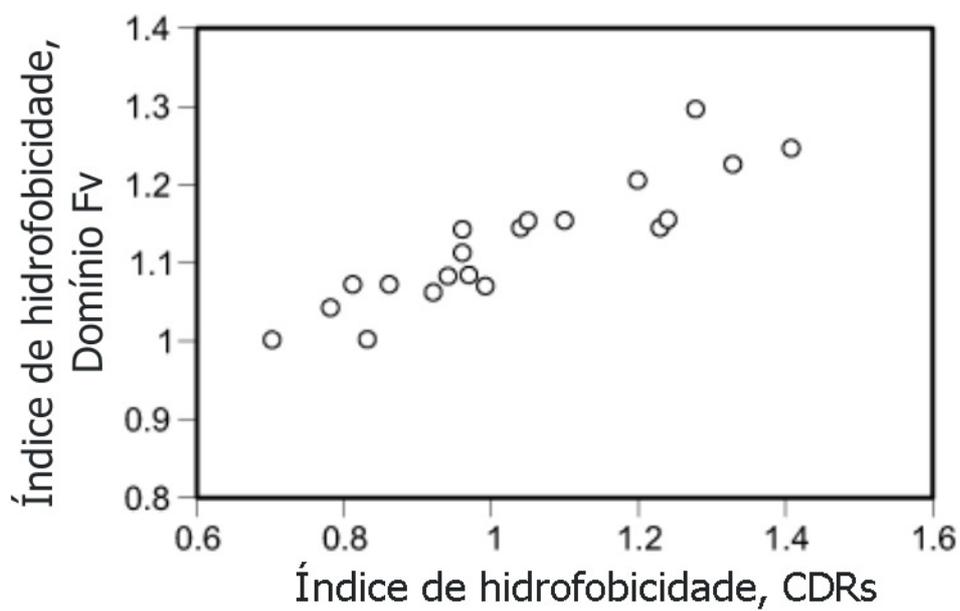


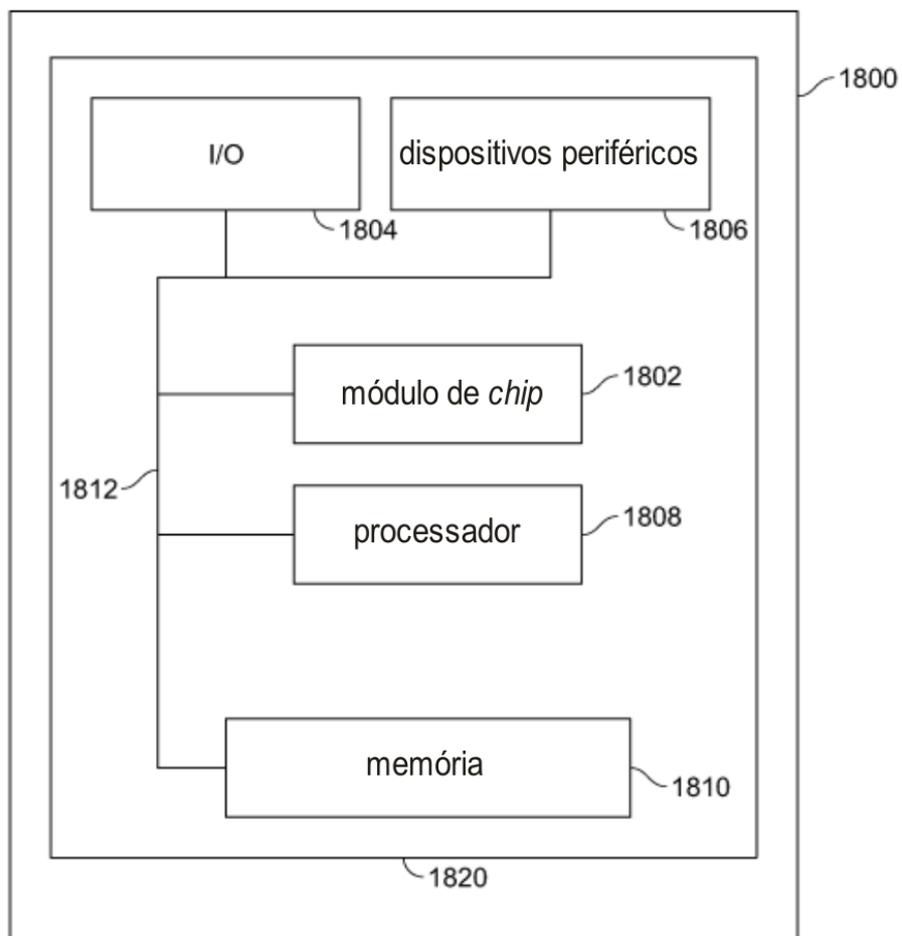
Figura 15D



**Figura 16**



**Figura 17**

**Figura 18**

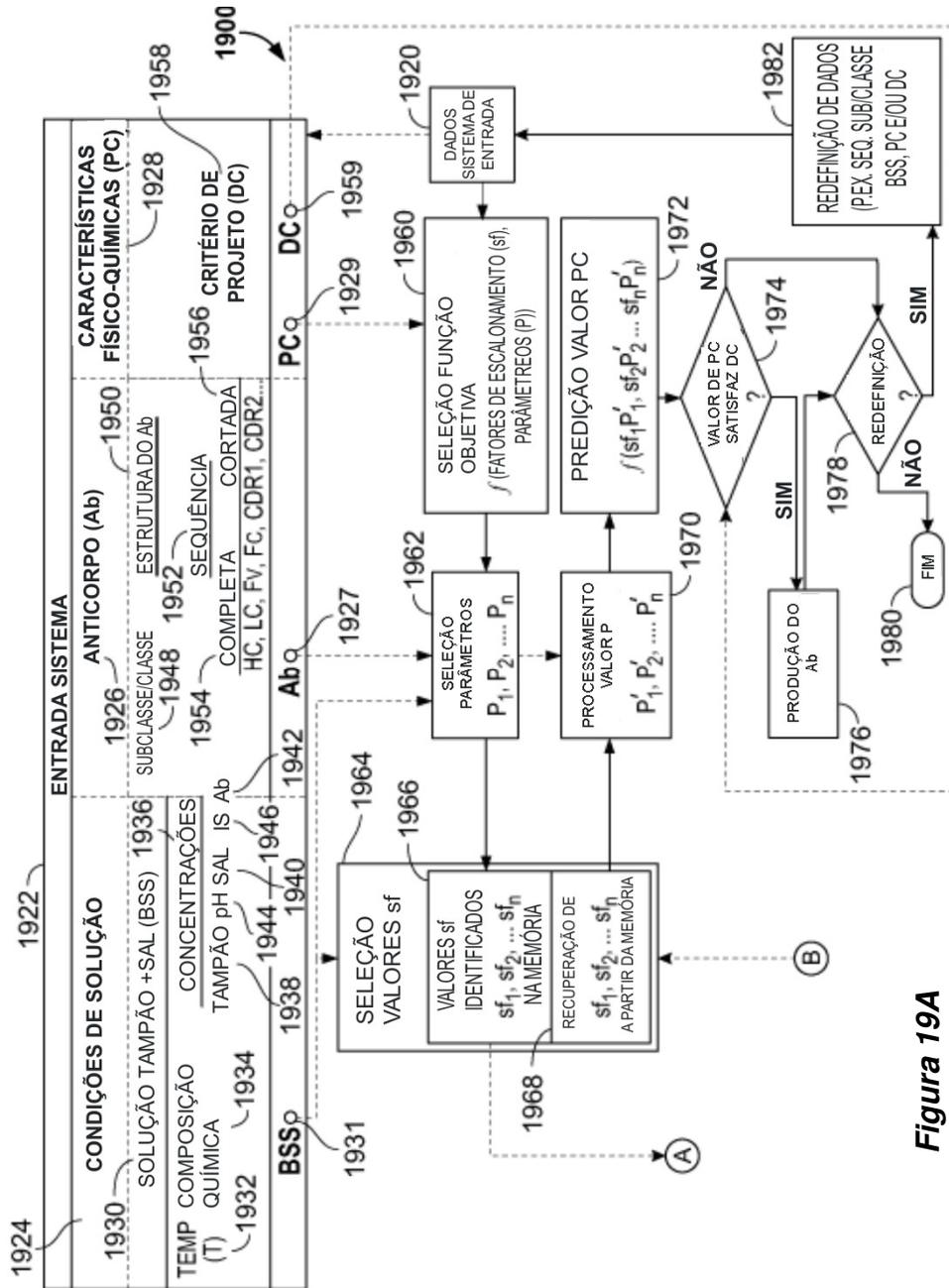


Figura 19A

