(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 551 854**

(51) Int. CI.:

C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10719752 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2424889**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de anticuerpos de dominio**

(30) Prioridad:

30.04.2009 US 174184 P
16.02.2010 US 304834 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2015

(73) Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

(72) Inventor/es:

SCHOTTE, PETER;
STANSSENS, PATRICK;
LABEUR, CHRISTINE;
JONNIAUX, JEAN-LUC y
LAUWEREYS, MARC JOZEF

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de anticuerpos de dominio

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está basada en el sorprendente descubrimiento de que la expresión de anticuerpos de dominio en hospedadores de levadura da como resultado una variante relacionada con producto que carece de la formación de al menos un enlace disulfuro, pero no obstante es totalmente funcional en la mayoría de casos.

Por ello, la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la fabricación de inmunoglobulinas, en particular anticuerpos de dominio. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de anticuerpos de dominio homogéneos en que la proporción de variantes que carecen de al menos un puente disulfuro se reduce en gran medida o es nula. Esto es beneficioso, p.ej., en el contexto de una aplicación terapéutica del anticuerpo de dominio. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a anticuerpos de dominio mejorados para uso terapéutico, obtenibles mediante procedimientos de la presente invención.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo deben ser de muy alta calidad de producto. Esto requiere, entre otras cosas, homogeneidad en términos estructurales. Además, los costes de producción están fuertemente influidos por las dificultades encontradas durante el proceso de producción. Los bajos rendimientos o carencia de homogeneidad afectarán a la economía del proceso de producción, y por ello, a los costes globales de la terapia. Por ejemplo, las dificultades para separar las variantes estructurales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo deseado necesitarán estrategias de purificación complejas y costosas.

Entre otros requisitos, los anticuerpos terapéuticos o sus fragmentos deben estar apropiadamente plegados. El plegamiento de proteína es un proceso espontáneo que conduce a una estructura plegada única que depende de la secuencia aminoacídica dada. Las proteínas de superficie celular y secretadas, tales como inmunoglobulinas, contienen a menudo enlaces disulfuro (a los que se hace referencia también como puentes disulfuro) que ligan covalentemente dos cisteínas y confieren estabilidad estructural en el entorno fuera de la célula. Es un evento importante en el plegamiento de estas proteínas por lo tanto la formación de estos enlaces disulfuro. El número y posición de los puentes disulfuro se determinará por el número y localización de los residuos de cisteínas adecuados en la secuencia aminoacídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

La formación correcta de todos los puentes disulfuro es fundamental para el plegamiento apropiado y la estabilidad del producto obtenido. Las proteínas que comprenden enlaces disulfuro son a menudo difíciles de expresar recombinantemente. Por ejemplo, la expresión de inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos, incluyendo fragmentos Fab o scFv, es problemática en términos de rendimiento y funcionalidad. Por ejemplo, una molécula de IgG convencional comprende una multitud de enlaces disulfuro tanto en las cadenas individuales como entre las cuatro cadenas que constituyen la molécula completa. Los estudios anteriores han señalado ya las dificultades en la obtención de puentes disulfuro apropiadamente formados para moléculas de IgG y han investigado diversas condiciones *in vitro* (Litske y Dorrington J. Biol. Chem. 249: 5633, 1974).

En caso de que falten uno o más puentes disulfuro en una inmunoglobulina convencional (p.ej., IgG, IgA, IgE, IgM) o un fragmento derivado de las mismas, p.ej. Fab, F(ab')2 o scFv, la funcionalidad del producto resultante se compromete típicamente. No serán funcionales porciones significativas del producto obtenido por expresión recombinante debido al puente o puentes disulfuro faltantes, como se ha reseñado ampliamente en la materia. Además, en el caso de anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab o scFv, se ha reseñado que la formación de puentes disulfuro es limitante de la velocidad para la secreción de cualquier producto, para empezar.

Es conocido, p.ej., que la formación de Fab funcional, los dominios constantes de cadena pesada CH2 y CH3 o scFv está seriamente limitada. Por ejemplo, la cantidad de scFv funcional puede limitarse completamente por la formación correcta de disulfuro (Ryabova *et al.*, Nature Biotechn. 15: 79, 1997). La mayoría de la proteína puede formar agregados inactivos, a menos que se sobreexpresen varios auxiliares de plegamiento, incluyendo p.ej. proteína de unión a cadena pesada (BiP) y proteína disulfuro isomerasa (PDI), y actúen de forma dependiente de ATP (Mayer *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 29421, 2000; Lilie *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 14290, 1994; Vinci *et al.* J. Biol. Chem. 279: 15059, 2004; Merk *et al.*, J. Biochem. 125: 328, 1999; Xu *et al.*, Metabol. Engineer. 7: 269, 2005).

La limitación de la obtención de rendimientos adecuados de producto funcional se ha reseñado para inmunoglobulinas convencionales y sus fragmentos en un amplio intervalo de sistemas de expresión, incluyendo traducción *in vitro*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae,* células de ovario de hámster chino y sistemas de baculovirus en células de insectos o *P. pastoris*, entre otros (Ryabova *et al.*, Nature Biotechnology 15: 79, 1997; Humphreys *et al.*, FEBS Letters 380: 194, 1996; Shusta *et al.*, Nature Biotech. 16: 773, 1998; Hsu *et al.*, Protein Expr.& Purif. 7: 281, 1996; Mohan *et al.*, Biotechnol. & Bioeng. 98: 611, 2007; Xu *et al.*, Metabol. Engineer. 7: 269, 2005; Merk *et al.*,

J. Biochem. 125: 328, 1999; Whiteley *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 22556, 1997; Gasser *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94: 353, 2006). El documento WO 2006/058890, por ejemplo, resuelve el problema produciendo las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina o el fragmento de inmunoglobulina funcional en dos células hospedadoras separadas y replegando el fragmento de inmunoglobulina *ex vivo*.

Por tanto, la formación correcta de los puentes disulfuro canónicos se considera que es generalmente limitante de la expresión de anticuerpo convencional en microorganismos, incluyendo células hospedadoras de mamífero.

En contraposición con estas dificultades observadas con los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales o sus fragmentos, incluyendo Fab y scFv, los anticuerpos de dominio pueden expresarse fácilmente y secretarse en una forma totalmente funcional correctamente plegada a partir de hospedadores como *E. coli* o *P. pastoris* a una velocidad y nivel suficientes. Los anticuerpos de dominio se caracterizan por la formación del sitio de unión a antígeno mediante un dominio de anticuerpo único, que no requiere interacción con otro dominio (p.ej., en forma de interacción VH/VL) para el reconocimiento de antígeno. La producción de nanocuerpos, como un ejemplo específico de anticuerpo de dominio, en hospedadores eucarióticos inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito extensamente en el documento WO 94/25591. Rahbarizadeh *et al.* (Mol. Immunol. 43: 426, 2006) describen la expresión de dos VHH con especificidad por MUC1 en levadura, incluyendo la optimización de las condiciones de cultivo para la expresión de levadura.

El hecho de que puedan producirse fácilmente anticuerpos de dominio totalmente funcionales, p.ej., en *E. coli* o levadura representa una ventaja importante de este formato de inmunoglobulina frente a las inmunoglobulinas convencionales. La producción de anticuerpos de dominio en *E. coli* y levadura da como resultado un buen rendimiento de producto funcional. Los problemas de obtención de suficientes cantidades de producto funcional conocidos de otros formatos de inmunoglobulina son por ellos desconocidos para los anticuerpos de dominio.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Sorprendentemente, a pesar del buen rendimiento y funcionalidad, se ha observado una variante relacionada con producto en la expresión de anticuerpos de dominio en levadura. La presente invención se refiere a procedimientos mejorados de producción de anticuerpos de dominio, caracterizados por la reducción o ausencia de la variante relacionada con producto.

Los presentes inventores han observado inesperadamente que, a pesar del alto rendimiento y funcionalidad de los anticuerpos de dominio producidos en levadura, hay una fracción cuantitativamente significativa de producto que representa un variante estructural. En particular, se ha encontrado inesperadamente que una fracción del producto carece de al menos un enlace disulfuro. El descubrimiento de cantidades considerables de dicha variante en levadura era enteramente inesperado. Se ha reseñado regularmente en la materia que los anticuerpos convencionales, o fragmentos de los mismos, que carecen de al menos un enlace disulfuro se caracterizan por la pérdida de función, típicamente junto con problemas en la secreción a partir del hospedador.

Por ello, en un aspecto la presente invención se refiere a identificar y caracterizar la variante relacionada con producto para empezar.

Basándose en la caracterización total de la variante relacionada con producto observada, se estableció por los inventores que la variante carecía de al menos un enlace disulfuro.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan procedimientos que reducen o eliminan la variante relacionada con producto que carece de al menos un enlace disulfuro.

En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de producción de anticuerpos de dominio que superan este problema inesperado.

Más específicamente, la presente invención proporciona procedimientos para reducir la formación de variantes que carecen de al menos un enlace disulfuro. Dichos procedimientos pueden radicar en adaptar las condiciones de cultivo en términos de temperatura, pH, conductividad y/o adición de extracto de levadura y/o peptona, así como adición de agentes oxidantes mientras se cultiva el hospedador.

Además, la presente invención comprende también el tratamiento de los anticuerpos de dominio después de la retirada del hospedador del medio de cultivo, concretamente durante una o más de las etapas de purificación, p.ej. mediante la adición de agentes oxidantes, aumentando el pH y/o la temperatura, aplicando una presión alta o aplicando condiciones de replegamiento, p.ej., exposición a un par rédox, con o sin presencia de un desnaturalizante. Además, la presente invención proporciona procedimientos de retirada de variantes que carecen de al menos un puente disulfuro, p.ej., mediante exposición a grupos tiol inmovilizados en presencia de un desnaturalizante, o por HPLC-FI.

Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos para producir, en levadura, un anticuerpo de

dominio capaz de formar una unidad de unión a antígeno única y caracterizada por un nivel disminuido o la ausencia de una variante de anticuerpo de dominio que carece de al menos un enlace disulfuro, que comprenden:

a) aplicar condiciones que promuevan la formación de puentes disulfuro en anticuerpos de dominio, o

b) retirar los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro aplicando condiciones seleccionadas de:

i) unión de anticuerpos de dominio que comprenden grupos tiol libres a grupos reactivos adecuados, opcionalmente en condiciones desnaturalizantes; y

ii) cromatografía de alta resolución en fase inversa, o

c) una combinación de (a) y (b).

Las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro se seleccionan de una o más de las siguientes:

a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;

b) potenciación de la expresión de una proteína disulfuro isomerasa (PDI) con una secuencia de control adecuada o aumentando la dosis génica;

c) adaptación de las condiciones de cultivo mediante uno o más seleccionados de los siguientes: rebajar la temperatura de cultivo y/u optimizar el medio de cultivo incluyendo, pero sin limitación, la reducción de la alimentación de metanol para hospedadores que requieran una alimentación de metanol, la rebaja de la conductividad del medio de cultivo, la adición de extracto de levadura y/o peptona o cualquier combinación de los mismos; en realizaciones particulares, dicha temperatura de cultivo se rebaja en 5 ºC en comparación con la temperatura de cultivo estándar para el organismo hospedador, y/o dicha alimentación de metanol se rebaja un 30-80 % en comparación con la alimentación de metanol estándar para el hospedador respectivo y/o dicha conductividad del medio de cultivo se rebaja un 30 a 80 % en comparación con el medio estándar para el hospedador respectivo, y/o se añaden extracto de levadura y/o peptona al medio de cultivo en una cantidad de 0 a 20 % de la alimentación;

d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de tampón rédox, preferiblemente con la presencia adicional de desnaturalizante, por ejemplo, replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de desnaturalizante y tampón rédox usando clorhidrato de guanidinio 2 M y cistamina/cisteamina 1:5 mM/mM);

e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de temperatura, aumento del pH o alta presión o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, tratamiento del anticuerpo de dominio por aumento de la temperatura a 40-60 ºC, preferiblemente 55 ºC, aumento del pH a pH 8-9, y/o sometimiento del anticuerpo de dominio a alta presión, por ejemplo de 25 a 1.000 MPa, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 MPa, opcionalmente combinado con oxigenación por purgado con oxígeno; y

f) combinaciones de cualquiera de a) a e).

La presente invención se refiere también a un procedimiento para producir, en una levadura, un anticuerpo de dominio capaz de formar una unidad de unión a antígeno única y, que comprende

I) aplicar condiciones que promuevan la formación de puentes disulfuro en anticuerpos de dominio, p

II) retirar los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro aplicando condiciones seleccionadas de:

i) unión de anticuerpos de dominio que comprenden grupos tiol libres a grupos reactivos adecuados, opcionalmente en condiciones desnaturalizantes; y

ii) cromatografía de alta resolución en fase inversa, o

III) una combinación de (I) y (II);

en el que

las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro se seleccionan de una o más de las siguientes:

a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+ a al menos una etapa de producción seleccionada de: caldo de cultivo después de la fermentación, sobrenadante que comprende el anticuerpo de dominio después de la retirada del hospedador, cualquier etapa después de la purificación del anticuerpo de dominio o el anticuerpo de dominio purificado; o

adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, a una concentración final de 0,15 a 10 mM, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+; o

adición de Cu2+ a una concentración final de 0,1 a 10 mM;

b) potenciación de la expresión de una proteína disulfuro isomerasa (PDI) con un promotor de control adecuado o aumentando la dosis génica;

c) adaptación de las condiciones de cultivo mediante uno o más seleccionados de los siguientes: rebaja de la temperatura de cultivo a 25 ºC, reducción de la alimentación de metanol para *Pichia* a ≤ 5 ml/l·h, rebaja de la conductividad del medio de cultivo a ≤ 28 mS/Cm o cualquier combinación de los mismos;

d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de tampón rédox, preferiblemente en presencia adicional de desnaturalizante;

e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de la temperatura a 40-60 ºC, aumento del pH a 8-9 o cualquier combinación de los mismos; y

f) combinaciones de cualquiera de a) a e).

La invención se refiere también a procedimientos como se exponen anteriormente, en los que se añade un agente

oxidante, preferiblemente iones metálicos oxidantes, más preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+, a al menos una etapa de producción del anticuerpo de dominio, preferiblemente seleccionada de: cultivo del hospedador para producir el anticuerpo de dominio, caldo de cultivo después de la fermentación, sobrenadante que comprende el anticuerpo de dominio después de la retirada del hospedador, cualquier etapa después de la purificación del anticuerpo de dominio o anticuerpo de dominio purificado.

En los procedimientos como se describen anteriormente, las condiciones que retiran los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro se seleccionan de:
a) unir anticuerpos de dominio que comprenden grupos tiol libres a grupos reactivos adecuados, incluyendo pero sin limitación grupos tiol inmovilizados, opcionalmente en condiciones desnaturalizantes;
b) cromatografía de alta resolución en fase inversa.

La invención se refiere también a cualquiera de los procedimientos anteriores, en los que dicha adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+, más preferiblemente Cu2+ 1-10 mM, se efectúa sola o en combinación con una o más de las condiciones descritas anteriormente.

En realizaciones particulares de la invención, la levadura es *Pichia, Hansenula, Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Torulopsis, Torulaspora, Schizosaccharomyces, Citeromyces, Pachysolen, Debaromyces, Metschunikowia, Rhodosporidium, Leucosporidium, Botryoascus, Sporidiobolus, Endomycopsis*, preferiblemente *Pichia pastoris*.

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio que comprenden o consisten esencialmente en, pero sin limitación, un anticuerpo de dominio que es una secuencia de dominio variable de cadena ligera o una secuencia de dominio variable de cadena pesada, más específicamente un anticuerpo de dominio que es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada, en particular un anticuerpo de dominio (o una secuencia aminoacídica que es adecuada para uso como anticuerpo de dominio) que es un anticuerpo de dominio único (o una secuencia aminoacídica que es adecuada para uso como un anticuerpo de dominio único), un "dAb" (o una secuencia aminoacídica que es adecuada para uso como dAb) o un nanocuerpo (incluyendo, pero sin limitación, una secuencia de VHH), preferiblemente un nanocuerpo.

El procedimiento según la presente invención como se describe anteriormente comprende al menos las etapas de cultivar el hospedador para producir el anticuerpo de dominio, que comprenden:
i) cultivar dicho hospedador o célula de hospedador en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique;
ii) mantener un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el anticuerpo de dominio
opcionalmente seguido de:
iii) aislar y/o purificar el anticuerpo de dominio secretado a partir del medio.

Según la invención, los procedimientos son como se describen anteriormente, en los que las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro se aplican en una o más de la etapa i), etapa ii), después de la etapa ii) o en o después de la etapa iii) o las condiciones que retiran los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro se aplican después de la etapa ii).

La solicitud da a conocer también anticuerpos de dominio obtenibles mediante cualquiera de los procedimientos expuestos en la presente memoria, composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden dichos anticuerpos de dominio y usos terapéuticos de los anticuerpos de dominio o procedimientos que comprenden el uso de los anticuerpos de dominio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Cromatograma de SEC-HPLC de dos lotes de RANKL008a de *E. coli* en comparación con un lote preparado a partir de la fermentación de *P. pastoris*; todos los lotes se han purificado usando protocolos de purificación similares. Eje X: tiempo de retención en minutos, eje Y: DO monitorizada a 280 nm.

Las Figuras 2 y 3 ilustran la comparación del material de *E. coli* y *P. pastoris* tras análisis por IEX-HPLC. Una ampliación del área de la base del pico principal (Figura 3) muestra que los materiales preparados a partir de fermentaciones de *P. pastoris* muestran menos prepicos y postpicos menores y menos pronunciados.

Figura 4: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a derivado de *E. coli* (línea continua) en comparación con material derivado de *P. pastoris* (línea de puntos). Eje X: tiempo de retención en minutos, eje Y: DO monitorizada a 280 nm.

Figura 5: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a después de incubación con una resina de tiol-Sepharose 4b en presencia de urea 0 M a 6 M. Cromatogramas registrados a 280 nm. La condición de urea 6 M muestra la retirada completa del postpico.

Figura 6: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a que contiene la variante relacionada con producto almacenada durante 2 semanas (trazo de puntos) o 4 (trazo de rayas) en comparación con el material almacenado a -70 ºC (señal continua). Los cromatogramas se registran a 280 nm.

Figura 7: Análisis de HPLC-FI de diferentes lotes de RANKL008a purificado preparado a partir de fermentaciones en *E. coli* (trazo de rayas), expresión en el experimento de matraz agitado de *P. pastoris* con alimentaciones de metanol estándares (trazo de puntos) en comparación con la expresión de fermentación alimentada por lotes en *P. pastoris* usando una estrategia de baja alimentación de metanol (4 ml/h·l, trazo continuo).

Figura 8: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a (lote P#270308nr1) mezclado con GdnHCl 2,0 M ("GuHCl" en la figura) durante 30 minutos a TA (trazo continuo) y posteriormente diluido en tampón rédox de cistamina/cisteamina 1:5 (mM:mM) a una concentración final entre GdnHCl 1,0 M y 0,125 M como se indica y posterior incubación durante una noche a 4 ºC. Se aplicaron directamente las muestras a la columna. Los trazos se registran a 214 nm.

Figura 9: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a (lote P#080408nr2) sometido a replegamiento durante una noche a temperatura ambiente en D-PBS. Se refleja el material no tratado en el trazo de rayas, se representa la muestra tratada con GdnHCl 1 M ("GuHCl" en la figura) y cistamina 5 mM y cisteamina 1 mM en el trazo de puntos, mientras que el trazo continuo representa el replegamiento en tampón que contiene GdnHCl 2 M, cistamina 5 mM y cisteamina 1 mM. Se inyectaron las muestras directamente en la columna. Los cromatogramas se registran a 280 nm.

Figura 10: RANKL008a (lote P#27C308nr1) diluido en tampón D-PBS que contiene GdnHCl 2 M, cistamina 5 mM y cisteamina 1 mM, se tomaron muestras en los puntos temporales indicados en la figura y se analizaron directamente por HPLC-FI. Los cromatogramas se registran a 280 nm.

Figura 11: Análisis de HPLC-FI de RANKL008a y los cromatogramas se registran a 280 nm. La adición de diferentes concentraciones de $CuSO_4$ conduce a una desaparición completa del postpico.

Figura 12: Perfiles de HPLC-FI de 13h5-9GS-13h5 no tratado y tratado con Cu.

Figura 13: Perfiles de TSA para 13h5-9GS-13h5 no tratado y tratado con Cu.

Figura 14: Cromatogramas de UV 280 de RANKL008a producido en *Pichia* (panel superior) y *Saccharomyces* (panel medio) con los datos respectivos de integración manual y una superposición de ambas señale (panel inferior). Tanto *Saccharomyces* como *Pichia* producían RANKL008a que contiene el postpico que representa la proteína con un puente disulfuro faltante como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 15: Análisis de HPLC-FI del nanocuerpo A-2 antes y después de tratamiento con $CuSO_4$ 1 M durante 2 horas. Los dos postpicos han desaparecido completamente en la muestra tratada con Cu. Obsérvese que, debido a la menor carga para la muestra tratada con Cu, la altura de pico del pico principal y picos secundarios es menor que para la muestra no tratada. Los cromatogramas se registraron a 280 nm.

Figura 16: Análisis de HPLC-FI del nanocuerpo A-3.

Figura 17: Análisis de HPLC-FI de una muestra de caldo de cultivo clarificado después de la depuración de los nanocuerpos B-1 (A), B-2 (C), E-3 (D) y B-4 (B) ensayados en fermentador a escala de 2 l, directamente después de la recolección (línea continua) y después de 4 horas de incubación con Cu^{2+} ($CuSO_4$ 10 µM) (línea de puntos).

Figura 18: Análisis de HPLC-FI del nanocuerpo B-5 purificado almacenado a -70 ºC (línea de puntos) y después de 3 semanas de almacenamiento a 37 º C (línea continua).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

A menos que se indiquen o definan de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la materia, que resultará evidente para el especialista. Se hace referencia, por ejemplo, a manuales estándares tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y., (1985); Old *et al.*, "Principles of Gene Manipulation; An introduction io Genetic Engineering", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6ª Ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, “Roitt' s Essential Immunology”, 10ª Ed. Blackwell Publishing, RU (2001) y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica antecedente general citada en los mismos.

Anticuerpos de dominio

El término “anticuerpo de dominio”, usado intercambiablemente con “anticuerpo de dominio único”, “dominio variable único” y “dominio variable único de inmunoglobulina” define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un único dominio de inmunoglobulina. Esto distingue a los anticuerpos de dominio de las inmunoglobulinas “convencionales” o sus fragmentos, en los que interaccionan dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, formando un sitio de unión a antígeno. Típicamente, en las inmunoglobulinas convencionales, interaccionan un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) formando un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, concretamente estarán implicadas un total de 6 CDR en la formación de sitio de unión a antígeno.

En contraposición, el sitio de unión de un anticuerpo de dominio se forma por un único dominio VH o VL. Por ello, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de dominio se forma por no más de tres CDR.

El término “anticuerpo de dominio”, “anticuerpo de dominio único”, “dominio variable único” o “dominio variable único de inmunoglobulina” no comprende por ello inmunoglobulinas convencionales ni sus fragmentos, que requieren la interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión a antígeno. Sin embargo, estos términos comprenden fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en las que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable único.

Generalmente, los dominios variables únicos serán secuencias aminoacídicas que consisten esencialmente en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de dicha secuencia aminoacídica (que contendrá entonces habitualmente al menos algunos de los residuos aminoacídicos que forman al menos una de las CDR, como se describe adicionalmente en la presente memoria). Dichos dominios variables únicos y fragmentos son lo más preferiblemente aquellos que comprenden un plegamiento de inmunoglobulina o que son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un plegamiento de inmunoglobulina. Como tal, el dominio variable único puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena ligera (p.ej. una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (p.ej. una secuencia V_H o V_{HH}) o un fragmento adecuado de la misma; a condición de que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno única (concretamente, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable único, de tal modo que el dominio de unión a antígeno único no necesite interaccionar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, como es el caso por ejemplo de los dominios variables que están presentes, por ejemplo, en anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interaccionar con otro dominio variable, p.ej., mediante una interacción V_H/V_L, formando un dominio de unión a antígeno funcional). Por ejemplo, el dominio variable único de un anticuerpo de dominio (o una secuencia aminoacídica que sea adecuada para uso como anticuerpo de dominio) puede ser un anticuerpo de dominio único (o una secuencia aminoacídica que sea adecuada como anticuerpo de dominio único), un “dAb" o dAb (o una secuencia aminoacídica que sea adecuada para uso como dAb) o un nanocuerpo® (como se define en la presente memoria, e incluyendo pero sin limitación una secuencia V_{HH}) [Nota: nanocuerpo® y nanocuerpos® son marcas registradas de Ablynx N.V.]; otros dominios variables únicos o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de los anticuerpos de dominio (único), se hace también referencia a la técnica anterior citada en la presente memoria, así como al documento EP 0368684. Para el término "dAb", se hace referencia, por ejemplo, a Ward *et al.* (Nature 12 de octubre de 1989; 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.*, Trends Biotechnol., 2003, 23 (11): 484-490 así como por ejemplo a los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. Debería observarse también que, aunque menos preferido en el contexto de la presente invención porque no son de origen mamífero, los anticuerpos de dominio único o dominios variables únicos pueden derivar de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados “dominios IgNAR”, véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

En particular, la secuencia aminoacídica de la invención puede ser un nanocuerpo o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción adicional de V_{HH} y nanocuerpos, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans en Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302, así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes de la técnica generales: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics K. V. y Ablynx N. V.; WO 01/90190 del National Research Council of Canada; WO 03/025020 (= EP 1.433.793) del Institute of Antibodies; así como los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825 de Ablynx N. V. y las solicitudes de patente publicadas adicionales de Ablynx N. V. Se hace también referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionada en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Como se describe en estas referencias, los nanocuerpos (en particular secuencias de V_{HH} y nanocuerpos parcialmente humanizados) pueden

caracterizarse en particular por la presencia de uno o más “residuos distintivos” en una o más de las secuencias estructurales. Puede encontrarse una descripción adicional de los nanocuerpos, incluyendo la humanización y/o camelización de los nanocuerpos, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o “fusiones de nanocuerpo”, constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitantes de secuencias ligadoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los nanocuerpos y sus preparaciones, p.ej., en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

Por tanto, en el significado de la presente invención, el término “anticuerpo de dominio único”, “anticuerpo de dominio”, “dominio variable único” o “dominio variable único de inmunoglobulina” comprende polipéptidos que derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camello. Pueden estar humanizados, como se describe anteriormente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes no camélidas, p.ej. ratón o ser humano, que se han “camelizado” como se describe anteriormente.

A menos que se indique otra cosa, el término “secuencia de inmunoglobulina”, usado en la presente memoria para hacer referencia a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo como las cadenas individuales del mismo, así como partes, dominios y fragmentos del mismo (incluyendo, pero sin limitación, los dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como los dominios V_{HH} o dominios V_H/V_L, respectivamente). Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan intercambiablemente con secuencia de inmunoglobulina e incluyen nanocuerpos.

En una realización de la invención, los anticuerpos de dominio son secuencias de dominio variable de cadena ligera (p.ej., una secuencia V_L) o secuencias de dominio variable de cadena pesada (p.ej., una secuencia V_L); más específicamente, los anticuerpos de dominio pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional, o secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

Los anticuerpos de dominio proporcionados por la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (como se define en la presente memoria) o forman parte de una proteína o polipéptido de la invención (como se define en la presente memoria) que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más anticuerpos de dominio y que puede comprender opcionalmente además una o más secuencias aminoacídicas adicionales (todas opcionalmente ligadas mediante uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más anticuerpos de dominio pueden usarse como unidad de unión en dicha proteína o polipéptido, que puede contener opcionalmente una o más secuencias aminoacídicas adicionales que pueden servir como unidad de unión (concretamente, contra una o más dianas distintas de antígenos asociados a célula) para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente todos como se describen en la presente memoria. Dicha proteína o polipéptido puede estar también en forma esencialmente aislada (como se define en la presente memoria).

La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, asno, humano y camélido. La invención incluye también secuencias de inmunoglobulina totalmente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas o anticuerpos de dominio camelizados, p.ej., dAb camelizados como se describen por Ward *et al.* (véanse por ejemplo el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Además, la invención comprende secuencias de inmunoglobulinas condensadas, p.ej., que forman un constructo multivalente y/o multiespecífico (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, se hace también referencia a Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 276, 10, 7346-7350, 2001, así como por ejemplo a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden marcajes u otros restos funcionales, p.ej. toxinas, marcadores, productos radioquímicos, etc. que son derivables de las secuencias de inmunoglobulina de la presente invención.

Puede considerarse que la secuencia aminoacídica y la estructura de una secuencia de inmunoglobulina, en particular un nanocuerpo, comprenden, sin estar limitadas sin embargo a ello, 4 regiones estructurales o "FR" a las que se hace referencia en la materia y en la presente memoria como “región estructural 1” o “FR1”, como “región estructural 2” o “FR2”, como “región estructural 3” o “FR3” y como “región estructural 4” o “FR4”, respectivamente; estando interrumpidas dichas regiones estructurales por tres regiones determinantes de la complementariedad o “CDR” a las que se hace referencia en la técnica como “región determinante de la complementariedad 1” o “CDR1”, como “región determinante de la complementariedad 2” o “CDR2” y como “región determinante de la complementariedad 3” o “CDR3”, respectivamente.

Según la invención, los anticuerpos de dominio comprenden constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominios únicos, como se esboza anteriormente. Por ejemplo, pueden ligarse dos (o más) anticuerpos de dominio con la misma o diferente especificidad de antígeno formando, p.ej., un constructo divalente, trivalente o multivalente. Al combinar los anticuerpos de dominio de dos o más especificidades, pueden

formarse constructos biespecíficos, triespecíficos, etc. Por ejemplo, un anticuerpo de dominio según la invención puede comprender dos o tres anticuerpos de dominio dirigidos contra la misma diana, o dos anticuerpos de dominio dirigidos contra la diana A y un anticuerpo de dominio contra la diana B. Dichos constructos y modificaciones de los mismos, que el especialista puede fácilmente concebir, están todos englobados por el término anticuerpo de dominio como se usa en la presente memoria.

El número total de residuos aminoacídicos en un nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115, y es lo más preferiblemente de 113. Debería observarse sin embargo que las partes, fragmentos, análogos o derivados (como se describen adicionalmente en la presente memoria) de un nanocuerpo no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, a condición de que dichas partes, fragmentos, análogos o derivados satisfagan los requisitos adicionales esbozados en la presente memoria y sean también preferiblemente adecuados para los fines descritos en la presente memoria.

Los anticuerpos de dominio comprenderán a menudo al menos un puente disulfuro intradominio entre la cisteína 22 y la cisteína 92 (residuos numerados según la numeración de Kabat). A veces, los nanocuerpos comprenden un puente disulfuro entre CDR3 y Cys45 en la región estructural FR2. Puede haber también un enlace disulfuro entre CDR2 y CDR3, por ejemplo entre la cisteína 45 y CDR3 o entre la cisteína 50 y CDR3 (Muyldermans, 2001). Más específicamente, el análisis de la estructura cristalina de los anticuerpos de dominio ha exhibido 9 hebras β plegadas en dos láminas que se empaquetan entre sí y se estabilizan por un enlace disulfuro conservado. Los abundantes puentes disulfuro que se conoce que se forman en los anticuerpos convencionales entre las diferentes cadenas están ausentes de los anticuerpos de dominio.

Se hace referencia también a todas estas moléculas como “polipéptido de la invención”, que es sinónimo de “secuencias de inmunoglobulina de la invención".

Además, el término “secuencia” como se usa en la presente memoria (por ejemplo, en términos como “secuencia de inmunoglobulina”, “secuencia de anticuerpo”, “secuencia de dominio variable”, “secuencia de V_{HH}” o “secuencia de proteína”) debería entenderse que incluye tanto la secuencia aminoacídica relevante como las secuencias de ácido nucleico o secuencias nucleotídicas que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Para una descripción general y algunos ejemplos no limitantes de nanocuerpos (y de polipéptidos que comprenden los mismos) que están dirigidos contra RANKL y que pueden expresarse/producirse usando los procedimientos descritos en la presente memoria, se hace referencia a la solicitud internacional WO 08/142164. Para una descripción general y algunos ejemplos no limitantes de nanocuerpos (y de polipéptidos que comprenden los mismos) que están dirigidos contra IL-6R y que pueden expresarse/producirse usando los procedimientos descritos en la presente memoria, se hace referencia a la solicitud internacional WO 08/020079, y en particular al documento WO 2010/115998 y al documento WO 2010/115995.

Para una descripción general y algunos ejemplos no limitantes de nanocuerpos (y de polipéptidos que comprenden los mismos) que están dirigidos contra IL-23 (y en particular la subunidad p19 de IL-23) y que pueden expresarse/producirse usando los procedimientos descritos en la presente memoria, se hace referencia a la solicitud internacional WO 09/068627, y en particular al documento WO 2010/142534.

Hospedadores

Los términos “hospedador” y “células hospedadoras” se usan intercambiablemente. La presente invención se refiere a hospedadores sin limitación distintos de *E. coli*, a condición de que sean adecuados para la producción de un anticuerpo de dominio. En particular, la presente invención se refiere a hospedadores no *E. coli* productores de anticuerpos de dominio, en los que los anticuerpos de dominio producidos carecen de al menos un puente disulfuro.

En la presente invención, los hospedadores no *E. coli* son levaduras tales como *Pichia, Hansenula, Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Torulopsis, Torulaspora, Schizosaccharomyces, Citeromyces, Pachysolen, Debaromyces, Metschunikowia, Rhodosporidium, Leucosporidium, Botryoascus, Sporidiobolus, Endomycopsis*. Se prefiere particularmente *P. pastoris*.

El hospedador de la presente invención será capaz de producir un anticuerpo de dominio. Estará típicamente modificado genéticamente para comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más anticuerpos de dominio. Los ejemplos no limitantes de modificaciones genéticas comprenden la transformación, p.ej. con un plásmido o vector, o la transducción con un vector vírico. Algunos hospedadores pueden ser genéticamente plásmidos o vectores, así como modificaciones directas del material genético del hospedador, p.ej. por integración en un cromosoma del hospedador, p.ej. por recombinación homóloga. A menudo, aparecerá una combinación de ambas, p.ej., un hospedador se transforma con un plásmido que, tras recombinación homóloga, se integrará (al menos parcialmente) en el cromosoma del hospedador. El especialista conoce procedimientos adecuados de modificación genética del hospedador para posibilitar que el hospedador produzca anticuerpos de dominio.

Puente disulfuro

Puente disulfuro o enlace disulfuro (usados intercambiablemente) significa el enlace covalente formado entre dos residuos de cisteína que están en una localización apropiada dentro de la secuencia aminoacídica de un anticuerpo de dominio. La presente invención se refiere por tanto a puentes disulfuro intradominio intramoleculares.

Típicamente, los anticuerpos de dominio, incluyendo los anticuerpos de dominio VH y VHH, engloban un enlace disulfuro conservado, lo más a menudo que liga C22 y C92 (según la numeración de Rabat). Algunos VHH pueden tener un puente disulfuro adicional que liga dos CDR, tales como CDR2 (p.ej., posición 50 según la numeración de Rabat) y CDR3, CDR1 y CDR2 o CDR1 y CDR3.

En constructos de anticuerpo de dominio que comprenden más de un dominio de anticuerpo, habrá un número respectivamente mayor de enlaces disulfuro. Por ejemplo, un constructo que comprende tres dominios de unión a antígeno (p.ej., tres dominios VHH), tendrá a menudo tres puentes disulfuro (uno por dominio VHH).

Cualquier referencia a enlace disulfuro o puente disulfuro ha de entenderse que hace referencia también a más de un enlace, concretamente a enlaces disulfuro o puentes disulfuro, a menos que se especifique otra cosa.

El puente disulfuro intramolecular en el anticuerpo de dominio se forma en el proceso de plegamiento de proteína y estabiliza la conformación apropiada del anticuerpo de dominio.

Se ha encontrado sorprendentemente que el enlace disulfuro en los anticuerpos de dominio, a pesar de su papel en la definición y/o estabilización de la estructura tridimensional en el transcurso del plegamiento de proteína, no es esencial para la producción eficaz del anticuerpo de dominio por el hospedador ni para su función. Esto representa una diferencia fundamental con informes en la materia según los cuales la unión disulfuro es decisiva para el rendimiento de producción y la función de los fragmentos de anticuerpo como fragmentos Fab (Gasser *et al*. Biotechnol. Bioeng. 94: 535, 2006).

En el contexto de esta solicitud, el término “variante relacionada con producto” significa un anticuerpo de dominio que carece de al menos un puente disulfuro. En un constructo que comprende, p.ej., tres dominios VHH, el término variante relacionada con producto englobará por consiguiente variantes que carecen, p.ej., de uno, dos o tres puentes disulfuro. En algunos casos, la variante relacionada con producto se abrevia como “variante”.

Procedimientos generales

El especialista es bien consciente de los procedimientos generales para producir anticuerpos de dominio en hospedadores no *E. coli*.

Por ejemplo, la producción de nanocuerpos en hospedadores eucarióticos inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito extensamente en el documento WO 94/25591. Se hace referencia explícitamente a los contenidos de esta solicitud con relación a las técnicas de cultivo y procedimientos generales, incluyendo medios y condiciones adecuados. El especialista puede también idear constructos genéticos adecuados para la expresión de anticuerpos de dominio en hospedadores no *E. coli* basándose en el conocimiento general común. La presente invención se refiere también a condiciones y constructos genéticos específicos descritos en la materia, por ejemplo a los procedimientos de cultivo, plásmidos, promotores y secuencias líder generales descritos en los documentos WO 94/25591, Gasser *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94: 535, 2006; Gasser *et al*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6499, 2007 o Damasceno *et al.* Microbiol. Biotechnol. 74: 381, 2007.

En una fracción significativa de los anticuerpos de dominio, en particular nanocuerpos producidos por hospedadores no *E. coli*, en particular *Pichia*, se observa la presencia de tiol libre debido a residuos de cisteína desapareados (aunque en la mayoría de casos estos nanocuerpos siguen estando funcionales y bien expresados). La ausencia de estos puentes disulfuro podría tener efecto sobre la calidad y homogeneidad del producto nanocuerpo final. Sin embargo, una alta calidad y homogeneidad de producto es un prerrequisito para, p.ej., el uso terapéutico de estos productos.

La presente invención proporciona procedimientos para la fabricación de anticuerpos de dominio en los que se mejora la calidad de los anticuerpos de dominio (concretamente, con un nivel reducido de tiol libre o su ausencia). La calidad de los anticuerpos de dominio se mejora aplicando condiciones especificadas en las que se promueve la formación del puente o puentes disulfuro faltantes durante el crecimiento del hospedador, durante la expresión del anticuerpo de dominio y/o después de la expresión (concretamente antes o después de la purificación del anticuerpo de dominio). La presente invención proporciona también procedimientos de retirada de la variante relacionada con producto.

Se entiende igualmente que cualquier referencia a condiciones que promuevan la formación de enlaces disulfuro significa condiciones que retiran o reducen la variante relacionada con producto y viceversa.

En el contexto de la presente invención, la “retirada” de variante relacionada con producto puede significar que se forman apropiadamente el puente o puentes disulfuro faltantes, de tal modo que la variante se vuelve estructuralmente idéntica al anticuerpo de dominio deseado. Como alternativa, retirada puede significar que se separa físicamente la variante relacionada con producto de la mezcla de anticuerpos de dominio que comprende tanto la especie de dominio de anticuerpo deseada que tiene todos los puentes disulfuro como la variante relacionada con producto. El significado correcto será evidente por el contexto. En una realización preferida, retirada tiene el primer significado, concretamente, la variante relacionada con producto forma todos los puentes disulfuro y se vuelve por tanto el anticuerpo de dominio deseado. En vista de la contribución cuantitativamente significativa de la variante relacionada con producto que, dependiendo de las condiciones de cultivo, puede ascender a 15-25 % del rendimiento de anticuerpo de dominio global, la conversión de la variante en el producto deseado en altamente ventajosa.

Más particularmente, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una inmunoglobulina que comprende al menos las etapas de:
i) cultivo de un hospedador o célula hospedadora (como se define en la presente memoria) en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique,
ii) mantenimiento de dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca la inmunoglobulina,
opcionalmente seguido de:
iii) aislamiento y/o purificación de la inmunoglobulina secretada a partir del medio,
en el que se aplican condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro en la etapa i), en la etapa ii), después de la etapa ii) y/o en o después de la etapa iii).

En una realización de la invención, se aplican las condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro en la etapa i). Por consiguiente, dicho procedimiento comprende al menos las etapas de: i) cultivo de un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique y que promuevan la formación de un puente disulfuro, p.ej., incluyendo al menos las siguientes:
a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;
b) potenciación de la expresión de una tiol isomerasa, que puede seleccionarse ventajosamente de PDI, calsecuestrina y otras proteínas relacionadas con PDI comprendiendo, pero sin limitación, ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 y PDIR, preferiblemente PDI;
c) adaptación de las condiciones de cultivo por uno o más seleccionados de los siguientes: rebaja de la temperatura de cultivo y/u optimización del medio de cultivo incluyendo, pero sin limitación, reducción de la alimentación de metanol para hospedadores que requieren una alimentación de metanol, rebaja de la conductividad del medio de cultivo, adición de extracto de levadura y/o peptona, todo como se describe adicionalmente en la presente memoria, o cualquier combinación de los mismos; y combinaciones de cualquiera de a) a c); ii) mantenimiento de dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca un anticuerpo de dominio, opcionalmente seguido de: iii) aislamiento y/o purificación del anticuerpo de dominio secretado a partir del medio.

En una realización de la invención, se aplica la condición que promueve la formación de un puente disulfuro en la etapa ii). Por consiguiente, dicho procedimiento comprende al menos las etapas de: i) cultivo de un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique y que promuevan la formación de un puente disulfuro, p.ej., incluyendo al menos las siguientes:
a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;
b) potenciación de la expresión de una tiol isomerasa, que puede seleccionarse ventajosamente de PDI, calsecuestrina y otras proteínas relacionadas con PDI comprendiendo, pero sin limitación, ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 y PDIR, preferiblemente PDI;
c) adaptación de las condiciones de cultivo por uno o más seleccionados de los siguientes: rebaja de la temperatura de cultivo y/u optimización del medio de cultivo incluyendo, pero sin limitación, reducción de la alimentación de metanol para hospedadores que requieren una alimentación de metanol, rebaja de la conductividad del medio de cultivo, adición de extracto de levadura y/o peptona, todo como se describe adicionalmente en la presente memoria, o cualquier combinación de los mismos; y combinaciones de cualquiera de a) a c); opcionalmente seguido de iii) aislamiento y/o purificación del anticuerpo de dominio secretado a partir del medio.

En una realización de la invención, las condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro se aplican después de la etapa ii). En una realización de la invención, las condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro se aplican antes de la etapa iii).

Por consiguiente, el procedimiento para producir un anticuerpo de dominio en un hospedador no *E. coli*, preferiblemente levadura, comprende al menos las etapas de: i) cultivo de un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique; ii) mantenimiento del hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el anticuerpo de dominio; mantenimiento del anticuerpo de dominio obtenido en la etapa ii) en

condiciones que promuevan la formación de un puente disulfuro, p.ej., en las siguientes condiciones:
a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;
b) potenciación de la expresión de una tiol isomerasa, que puede seleccionarse ventajosamente de PDI, calsecuestrina y otras proteínas relacionadas con PDI comprendiendo, pero sin limitación, ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 y PDIR, preferiblemente PDI;
c) adaptación de las condiciones de cultivo por uno o más seleccionados de los siguientes: rebaja de la temperatura de cultivo y/u optimización del medio de cultivo incluyendo, pero sin limitación, reducción de la alimentación de metanol para hospedadores que requieren una alimentación de metanol, rebaja de la conductividad del medio de cultivo, adición de extracto de levadura y/o peptona, como se describe adicionalmente en la presente memoria, o cualquier combinación de los mismos;
d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de un tampón rédox, preferiblemente en presencia adicionalmente de desnaturalizante, por ejemplo replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de desnaturalizante y tampón rédox usando clorhidrato de guanidinio 2 M y cistamina/cisteamina 1:5 mM/mM;
e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de temperatura o aumento del pH o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo tratamiento del anticuerpo de dominio por aumento de la temperatura a 40-60 ºC, preferiblemente 55 ºC, y/o aumento del pH a pH 8-9, opcionalmente combinado con oxigenación por purgado con oxígeno; y
f) combinaciones de cualquiera de a) a e); opcionalmente seguido de
iii) aislamiento y/o purificación del anticuerpo de dominio secretado a partir del medio.

La presente invención engloba también aplicar las condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro en o después de la etapa iii).

Por consiguiente, el procedimiento para producir un anticuerpo de dominio en un hospedador no *E. coli*, preferiblemente levadura, comprende las etapas de: i) cultivo de un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique; ii) mantenimiento de un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el anticuerpo de dominio; iii) aislamiento y/o purificación del anticuerpo de dominio secretado a partir del medio y aplicación de condiciones que promuevan la formación de un puente disulfuro, p.ej. en las siguientes condiciones:
a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;
d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de tampón rédox, preferiblemente con la presencia adicional de desnaturalizante, por ejemplo replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de desnaturalizante y tampón rédox usando clorhidrato de guanidinio 2 M y cistamina/cisteamina 1:5 mM/mM;
e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de temperatura, aumento del pH o alta presión o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo tratamiento del anticuerpo de dominio por aumento de la temperatura a 40-60 ºC, preferiblemente 55 ºC, aumento del pH a pH 8-9 y/o sometimiento del anticuerpo de dominio a alta presión, por ejemplo 25-1000 MPa, tal como aproximadamente 100 a 200 MPa, opcionalmente combinado con oxigenación por purgado con oxígeno y
f) combinaciones de cualquiera de a) a e).

La presente invención se refiere también a la combinación de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, la presente invención se refiere al cultivo y mantenimiento del hospedador no *E. coli* en condiciones que eviten o reduzcan la formación de la variante relacionada con producto que carece de al menos un puente disulfuro, en combinación con el mantenimiento del anticuerpo de dominio en condiciones que conduzcan a la retirada o reducción de la variante relacionada con producto. Puede concebirse fácilmente una combinación adicional adecuada por el especialista basándose en las enseñanzas de la presente solicitud.

En la presente invención, el hospedador puede retirarse del medio de cultivo por medios rutinarios. Por ejemplo, el hospedador puede retirarse mediante centrifugación o filtración. Se hace referencia también a la solución obtenida por retirada del hospedador del medio de cultivo como sobrenadante de cultivo, o sobrenadante de cultivo clarificado.

Según la presente invención, los anticuerpos de dominio pueden purificarse mediante procedimientos estándares a partir del sobrenadante de cultivo. Los procedimientos estándares incluyen, pero sin limitación, procedimientos cromatográficos incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos procedimientos pueden efectuarse solos o en combinación con otros procedimientos de purificación, p.ej. electroforesis en gel. El especialista puede idear combinaciones adecuadas de procedimientos de purificación para los anticuerpos de dominio basándose en el conocimiento general común. Para ejemplos específicos, se hace referencia a la materia citada en la presente memoria. Se prevé que cualquiera de las condiciones anteriores a), d), e), f), o una combinación de las mismas que promueva la formación de un puente disulfuro, pueda aplicarse también en o entre cualquier etapa de estos procedimientos de purificación. En una realización, pueden aplicarse cualquiera de las condiciones anteriores a), d), e), f) o una combinación de las mismas como parte de un procedimiento de purificación cromatográfica, p.ej. en los anticuerpos de dominio fijados a

una fase estacionaria de una columna cromatográfica. Los ejemplos de procesos de replegamiento cromatográfico representativos pueden incluir exclusión por tamaño (SEC); intercambio de disolvente durante la adsorción reversible en columna de proteína A o columna MEP HyperCel™; cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); cromatografía en fase inversa (RPC); cromatografía de intercambio iónico (IEX) o el uso de cualquier resina adecuada para la purificación de anticuerpo de dominio. El replegamiento en columna es atractivo porque se aplica fácilmente durante las etapas cromatográficas preparativas.

Las condiciones que promueven la formación de un puente disulfuro pueden aplicarse en la columna a una preparación parcial o altamente purificada de anticuerpo de dominio. Las condiciones pueden aplicarse también durante otra etapa, tal como en una fase sólida o durante la filtración o cualquier otra etapa de purificación.

En una realización ejemplar, puede purificarse anticuerpos de dominio a partir del sobrenadante de cultivo mediante una combinación de cromatografía de afinidad en proteína A, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. La referencia a cualquier “etapa de purificación” incluye, pero sin limitación, estos procedimientos particulares.

Más específicamente, pueden purificarse los anticuerpos de dominio a partir del sobrenadante de cultivo usando un proceso en el que se captura el sobrenadante clarificado (obtenido por centrifugación) en una resina de proteína A, seguido de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico en SOURCE 15S (GE Healthcare) y una etapa de SEC en Superdex 75 (GE Healthcare).

A continuación, se discuten con más detalle ejemplos particulares de condiciones que promueven la formación de enlaces disulfuro adecuados para los procedimientos según la presente invención. Se hará referencia también a aplicar estas condiciones como “tratamiento” del anticuerpo de dominio.

El especialista puede determinar fácilmente el tiempo de tratamiento adecuado para cualquiera de las etapas de procedimiento descritas a continuación. Pueden monitorizarse los efectos del tratamiento, concretamente la reducción de la variante relacionada con producto, por medios descritos en la presente memoria, p.ej. HPLC-FI. Los tiempos de tratamiento típicos oscilarán de 0,5 h a tratamiento durante una noche. En algunos casos, sin embargo, estará en el intervalo de 2 a 4 semanas, como se expone a continuación. Preferiblemente, el tiempo de tratamiento oscilará entre 1 y 12 h, más preferiblemente de 1 a 6 h y lo más preferiblemente de 1 a 3 h. En realizaciones ejemplares de la invención, el tiempo de tratamiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 h.

La temperatura de tratamiento dependerá de la etapa de aplicación del tratamiento. Si el tratamiento se efectúa durante la fase de cultivo del hospedador, la temperatura de tratamiento será la misma que la temperatura de cultivo, o menor que la temperatura de cultivo. El especialista conoce las temperaturas de cultivo adecuadas para diferentes hospedadores. Si el tratamiento se efectúa en presencia del hospedador, pero a una temperatura reducida, la temperatura puede ser, p.ej. 5 ºC menor que la temperatura de cultivo empleada habitualmente para el hospedador no *E. coli* respectivo. Son temperaturas de tratamiento ejemplares temperatura ambiente (22 ºC), 25 ºC, 30 ºC o 37 ºC.

Después de la retirada del hospedador, la temperatura puede elevarse también hasta 70 ºC, preferiblemente hasta 60 ºC, más preferiblemente hasta 55 ºC, en vista de la estabilidad a alta temperatura de los anticuerpos de dominio, en particular nanocuerpos. Es una temperatura de tratamiento preferible la temperatura ambiente.

Los diversos tratamientos pueden efectuarse a diferentes pH. Si el tratamiento se efectúa durante la fase de cultivo en presencia del hospedador, el pH se elegirá para ser adecuado para el hospedador. Después de la retirada del hospedador, el pH puede elegirse en un intervalo más amplio, p.ej. de pH 3 a 10, preferiblemente de 4 a 9. Los ejemplos específicos de pH adecuado comprenden un pH de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (cada uno ± 0,5).

Después de la retirada del hospedador, el anticuerpo de dominio puede estar presente en un amplio intervalo de tampones adecuados. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, PBS o Tris-HCl. El anticuerpo de dominio puede estar también presente en solución salina fisiológica. Preferiblemente, el anticuerpo de dominio está presente en un tampón que no contiene fosfatos.

Posteriormente a uno cualquiera, o a cualquier combinación de tratamientos según la presente invención, puede transferirse el anticuerpo de dominio a un nuevo sistema de tampón, si se desea. La transferencia puede lograrse por medios rutinarios. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio puede transferirse a PBS por diálisis. El anticuerpo de dominio puede transferirse también a solución salina fisiológica. El especialista puede elegir fácilmente otros sistemas de tampón adecuados.

a) Adición de agentes oxidantes

En una realización de la invención, pueden añadirse agentes oxidantes para promover la formación de enlaces disulfuro. Los agentes pueden añadirse durante el cultivo del hospedador y/o después de la retirada del hospedador. En una realización preferida de la invención, se usan agentes oxidantes después de la retirada del hospedador,

concretamente en el contexto de sobrenadante de cultivo, o en cualquier etapa de purificación del anticuerpo de dominio.

En la presente invención, son “agentes oxidantes” cualquier agente que pueda usarse para promover la formación de enlaces disulfuro. El especialista es bien consciente de los agentes que promueven la formación de enlaces disulfuro.

Los ejemplos específicos no limitantes de agentes oxidantes comprenden metales o iones metálicos, todos los agentes que pueden actuar como par rédox, todas las proteínas rédox (incluyendo PDI y proteínas que tienen actividades de replegamiento oxidativo, véase p.ej. Kimura *et al*. J. Biol. Chem. 280: 31438, 2005), cofactores tales como FAD (dinucleótido de flavina y adenina), FMN (mononucleótido de flavina), NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) y otros agentes oxidantes como H_2O_2 o DMSO. Los agentes oxidantes son habitualmente sustancias químicas con elementos de altos números de oxidación (p.ej., H_2O_2, MnO_4^-, CrO_3, $Cr_2O_7^{2-}$, OsO_4) o sustancias altamente electronegativas que pueden ganar uno o dos electrones extra oxidando una sustancia (O, F, Cl, Br, I), compuestos ricos en oxígeno con átomos en el estado de oxidación mayor posible (p.ej., permanganato de potasio, nitrato de potasio), así como cationes de metales preciosos.

La presente invención considera el uso de combinaciones de agentes oxidantes, p.ej. la combinación de más de un ión metálico oxidante, o la combinación de un ión metálico oxidante con uno o más agentes oxidantes adicionales, p.ej. como se expone anteriormente.

La lista de ejemplos específicos puede ampliarse fácilmente por el especialista basándose en las enseñanzas de la presente invención. El especialista entenderá también fácilmente en cuáles condiciones puede usarse adecuadamente cada agente oxidante. Dependiendo de las circunstancias particulares de exposición de los anticuerpos de dominio a agentes oxidantes, el especialista seleccionará diferentes clases adecuadas de agentes oxidantes.

Por ejemplo, la exposición al agente oxidante no debe dañar el anticuerpo de dominio, y preferiblemente no debería conducir a variantes estructurales distintas de aquellas que carecen de un puente disulfuro. En otras palabras, la exposición al agente oxidante debe realizarse en condiciones que favorezcan la formación de puentes disulfuro sin daño del anticuerpo de dominio. A este respecto, la alta estabilidad química de los anticuerpos de dominio es una gran ventaja.

Si el especialista elige añadir agentes oxidantes durante el cultivo del hospedador, el agente oxidante no debe comprometer la capacidad del hospedador de dividirse y/o producir el anticuerpo de dominio.

En una realización particular, el agente oxidante es oxígeno como tal. Por tanto, puede oxigenarse el cultivo del hospedador y/o sobrenadante de cultivo y/o solución del anticuerpo de dominio en cualquier etapa de purificación después de la retirada del hospedador. En este último caso, la oxigenación puede combinarse también con el aumento de la temperatura p.ej. hasta 55 ºC, y/o el aumento del pH p.ej. hasta pH 8 o 9.

En otra realización de la invención, pueden añadirse iones metálicos oxidantes al cultivo como tal, o a la solución que comprende anticuerpos de dominio después de la retirada del hospedador en cualquier etapa de purificación. Los ejemplos específicos no limitantes de iones metálicos comprenden Cu2+, Fe2+, Fe3+ o Zn2+. Los iones metálicos pueden añadirse en forma de una sal adecuada, por ejemplo como sulfatos. Es un ejemplo específico no limitante $CuSO_4$.

Pueden añadirse iones metálicos, incluyendo los ejemplos anteriores, p.ej. Cu2+, al cultivo del hospedador, o a la solución de anticuerpo de dominio, después de la retirada del hospedador en concentraciones micromolares a milimolares. Los ejemplos específicos incluyen una concentración final del ión metálico, p.ej. Cu2+, de entre 0,001 y 100 mM, preferiblemente de 0,01 a 10 mM, preferiblemente de 0,1 a 10 mM, preferiblemente de 0,15 a 10 mM, preferiblemente de 1 a 10 mM, más preferiblemente de 1 a 5 mM, por ejemplo de aproximadamente 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 5 mM o 10 mM. En una realización, la concentración de iones metálicos es mayor de 100 µM, preferiblemente mayor de 120 µM. En una realización particular, la solución comprende ión metálico 1 mM, preferiblemente Cu2+, más preferiblemente en forma de $CuSO_4$. En una realización, la concentración de $CuSO_4$ no está entre 5 µM y 100 µM.

Las concentraciones anteriores pueden usarse también para otros agentes oxidantes. Si se usa una combinación de agentes oxidantes, la concentración final de cada agente oxidante por sí mismo puede residir dentro de los intervalos de concentración especificados anteriormente.

Dichas concentraciones pueden aplicarse al medio de cultivo o a la solución que comprende anticuerpos de dominio después de la retirada del hospedador en cualquier etapa de purificación. En el caso de añadir ión metálico al medio de cultivo, el especialista puede valorar fácilmente la concentración que conduce a una reducción o anulación de la variante relacionada con producto mientras que no afecta a la viabilidad del hospedador, en particular no afecta a la capacidad de crecer y/o producir anticuerpo de dominio.

Según la invención, pueden aplicarse agentes oxidantes, en particular iones metálicos, a anticuerpos de dominio puros, o muestras semipurificadas (p.ej., anticuerpo de dominio que tiene una pureza > 80 %, más preferiblemente > 90 %, más preferiblemente > 95 %) o a material que está presente en el caldo de cultivo no clarificado y/o en el medio de cultivo clarificado. Según la invención, incluso en dichas mezclas de proteínas menos puras, la variante puede reducirse o retirarse al tratar las muestras con el agente oxidante. En una realización, no se añade al medio de cultivo el agente oxidante, en particular $CuSO_4$. En una realización, se aplica el agente oxidante al anticuerpo de dominio fijado a una fase estacionaria de una columna cromatográfica, como se describe en la presente memoria.

La temperatura a la que se añade el agente oxidante depende de la etapa de adición. Durante el cultivo, se aplicará la temperatura de cultivo. Después de la retirada del hospedador, pueden emplearse temperaturas mayores, si se desea. En una realización preferida, la temperatura será la temperatura ambiente después de la retirada del hospedador.

El agente oxidante puede añadirse a cualquier tampón adecuado. Puede ser necesario seleccionar un tampón que no forme sales precipitadas con el agente oxidante. Por ejemplo, la adición de $CuSO_4$ a PBS puede dar como resultado la formación de precipitados. En este caso, el especialista seleccionará otro tampón adecuado, p.ej. Tris-HCl, que no forma un precipitado con Cu^{2+}.

La duración del tratamiento puede determinarse fácilmente por el especialista, p.ej., monitorizando la reducción de la variante relacionada con producto. El tratamiento puede prolongarse durante varias fases, por ejemplo, puede prolongarse desde la fase de cultivo del hospedador hasta una o varias de las etapas de purificación del anticuerpo de dominio. Como alternativa, puede efectuarse el tratamiento, p.ej., en una única etapa de purificación de anticuerpo de dominio. Preferiblemente, se usa el agente oxidante durante una etapa temprana de la purificación de anticuerpo. Una vez se ha formado todo el puente o puentes disulfuro para convertir la variante relacionada con producto en el producto deseado, la estructura será estable en condiciones estándares (p.ej. en tampones como PBS o Tris-HCl, pH 4 a 10). Por tanto, si la variante relacionada con producto se convierte en el producto deseado en una etapa temprana del procedimiento de purificación, la variante no reaparecerá espontáneamente. Por tanto, puede efectuarse el resto del procedimiento de purificación con el producto homogéneo deseado. Además, el agente oxidante puede retirarse mediante las etapas de purificación después de la etapa que incluye tratamiento con el agente oxidante. Esto tiene la ventaja adicional de que el producto final estará libre de agente oxidante.

En una realización preferida, se tratan los anticuerpos de dominio en cualquier etapa después de la retirada de hospedador mediante la adición de una sal metálica, preferiblemente $CuSO_4$ a una concentración final de 1 mM a temperatura ambiente durante al menos 2 h. Más preferiblemente, se efectúa el tratamiento con un ión metálico, p.ej. Cu2+, en el sobrenadante de cultivo clarificado a un pH de 4 durante al menos 2 h.

Se ha reseñado anteriormente el uso de $CuSO_4$ en el contexto de la producción de anticuerpos humanizados convencionales que comprenden 16 enlaces disulfuro por células CHO (Chaderjian *et al.* Biotechnol. 21: 550, 2005). En este caso, se añadió $CuSO_4$ 5-100 µM a un cultivo de células CHO. A la máxima concentración, la viabilidad del hospedador estaba ya comprometida.

Según la presente invención, la adición de un agente oxidante adecuado para promover la formación de puentes disulfuro puede dar como resultado la retirada rápida y completa de la variante de producto que carece de al menos un enlace disulfuro. A este respecto, retirada significa que la variante forma el puente o puentes disulfuro faltantes y por tanto se vuelve estructuralmente idéntica al anticuerpo de dominio deseado.

b) Aumento de una tiol isomerasa, preferiblemente proteína disulfuro isomerasa, en el hospedador.

Se ha mostrado que la enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI), una proteína de 55 kDa, es un catalizador del plegamiento de proteína, la formación de enlace disulfuro y la isomerización en el retículo endoplásmico (RE) de células eucarióticas (Freedman *et al.* Trends Biochem. Sci. 19: 331, 1994; Wilkinson *et al.* 2005, J. Biol. Chem. 280: 11483). La PDI está implicada en la formación de la estructura de inmunoglobulinas *in vivo* (González *et al.* Biotechnol. Prog., 17: 217, 2001; Nilsson *et al.* Immunol. Lett. 94: 83, 2004). En hospedadores como *Saccharomyces*, se han reseñado proteínas adicionales que tienen actividades de replegamiento oxidativo (Kimura *et al.*, J. Biol. Chem. 280: 31438, 2005).

Se ha aplicado la coexpresión de anticuerpos convencionales o sus fragmentos, como Fab o scFv, con PDI para aumentar las velocidades y/o niveles de secreción de producto funcional en hospedadores como E. *coli, Saccharomyces,* CHO, transfección de baculovirs en células de insecto, o *Pichia* (Humphreys *et al.* FEBS Lett. 380: 194, 1996; Hsu *et al.* Protein Expr. Purif. 7: 281, 1996; Shusta *et al.* Nat. Biotechnol. 16: 773, 1998; Xu *et al.* Metabolic Engineering 7: 269, 2005; Borth *et al.* Biotechnol. Prog. 21: 106, 2005; Mohan *et al.* Biotechnology and Bioengineering 98: 611, 2007; Damasceno *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 381, 2007; Gasser *et al.* Appl. & Env. Microbiol. 73: 6499, 2007). En estos procedimientos, se aplicó la coexpresión con PDI para obtener velocidades y/o niveles aumentados de producto funcional.

En contraposición, la coexpresión con PDI no es un requisito para la producción eficaz de anticuerpos de dominio, p.ej. en *E. coli*. Se han conseguido buenos rendimientos de anticuerpos de dominio completamente funcionales mediante expresión recombinante en *E. coli.*

Sin embargo, en una fracción de los anticuerpos de dominio, en particular nanocuerpos obtenidos de levaduras, más particularmente *Pichia*, se observó la presencia de tiol libre debido a residuos de cisteína desapareados. Este descubrimiento era enteramente inesperado, porque la mayoría de estos dominios de anticuerpo, en particular nanocuerpos, seguían estando funcionales y bien expresados.

En consecuencia, en una realización adicional de la invención, puede potenciarse la expresión de una tiol isomerasa en el hospedador mediante medios comúnmente conocidos, incluyendo p.ej. el uso de secuencias de control adecuadas, p.ej. un promotor fuerte, y/o aumentando la dosis génica, p.ej. aumentando el número de copias del gen respectivo. El número de copias puede aumentarse, p.ej., introduciendo constructos genéticos adecuados para la expresión de tiol isomerasa. Si el hospedador comprende ya tiol isomerasa endógena, la presencia adicional del plásmido aumentará el número de copias global. En este caso, la tiol isomerasa puede ser la misma o diferente que la tiol isomerasa endógena del hospedador. En el caso de que el hospedador no contenga tiol isomerasa endógena, la introducción de tiol isomerasa exógena, p.ej. en forma de un plásmido o vector, aumenta también el número de copias en este hospedador, incluso si está presente como una única copia.

Además, pueden usarse constructos genéticos que pueden multiplicarse independientemente del genoma del hospedador y que están presentes en múltiples copias en el hospedador. Por ejemplo, pueden estar presentes plásmidos o vectores de múltiples copias en números de copias de entre 5 y 50 en la célula hospedadora.

El especialista conocerá una multitud de posibilidades de potenciación de la expresión de tiol isomerasa, todas las cuales están englobadas por la presente invención. El especialista puede valorar también fácilmente, basándose en medios rutinarios, que esté presente la correlación esperada entre dosis génica potenciada y actividad enzimática potenciada. Lo más importante, puede monitorizarse la reducción de la variante relacionada con producto.

Por ello, puede coexpresarse el anticuerpo de dominio en el hospedador con una tiol isomerasa. Este enfoque puede tomarse solo o en combinación con cualquier otro enfoque para evitar, reducir o retirar variantes relacionadas con producto como se describen en la presente memoria.

Los ejemplos específicos de tiol isomerasas incluyen, pero sin limitación, calsecuestrina y otras proteínas relacionadas con PDI como ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 y PDIR, preferiblemente proteína disulfuro isomerasa (PDI).

La tiol isomerasa y el anticuerpo de dominio pueden expresarse a partir del mismo o diferentes ácidos nucleicos, p.ej. el mismo o diferentes vectores o plásmidos. Se hace referencia también a un ácido nucleico adecuado para la transformación en un hospedador y/o la expresión del anticuerpo de dominio en el hospedador como constructo genético. Dicho constructo genético comprende a menudo elementos reguladores, tales como promotores, elementos potenciadores, secuencias de poliadenilación, etc. adecuados.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a ácidos nucleicos o constructos genéticos que codifican un anticuerpo de dominio y una tiol isomerasa. Además, la presente invención se refiere a hospedadores que comprenden dichos constructos genéticos o ácidos nucleicos.

El especialista puede introducir los ácidos nucleicos de la invención en hospedadores mediante medidas rutinarias, p.ej. mediante transformación. El especialista puede seleccionar entonces las células hospedadoras adecuadas que comprenden los ácidos nucleicos, p.ej., monitorizando la expresión de la tiol isomerasa al nivel de ácido nucleico y/o proteína. Se seleccionará una cepa con un nivel satisfactorio de expresión. Es deseable una alta expresión de tiol isomerasa, sin embargo, no debería ser tan alta como para dar como resultado la competición con la expresión del anticuerpo de dominio. Esto puede determinarse mediante procedimientos rutinarios.

Para orientación adicional, el especialista puede consultar la secuencia ejemplar de PDI proporcionada en la parte experimental de la solicitud, la entrada de GenBank NP_009887 o las secuencias reseñadas en la materia (véanse, p.ej., Wilkinson *et al*. J. Biol. Chem. 280: 11483, 2005; Mayer *et al*. 341: 1077, 2004). Son conocidas en la materia proteínas adicionales que tienen actividades de replegamiento oxidativo y pueden usarse en el contexto de la presente invención, solas o preferiblemente en combinación con las tiol isomerasas expuestas anteriormente (Kimura *et al.* J. Biol. Chem. 280: 31438, 2005). Se consideran también para expresión en combinación con tiol isomerasas factores conocidos por potenciar la secreción de proteína heteróloga en levaduras, como se describen, p.ej., en Gasser *et al*. (Appl. Environm Microbiol. 73: 6499, 2007) o Damascene *et al*. (Microbiol. Biotechnol. 74: 381, 2007).

Se ejemplifican también procedimientos para clonar PDI en un vector adecuado y transformar hospedadores, así como la selección de transformantes adecuados. El especialista puede seleccionar uno cualquiera o más de estos aspectos para llegar a realizaciones de la invención, solos o en combinación con cualquiera de las enseñanzas

generales de la solicitud.

Según la invención, la coexpresión de una tiol isomerasa con un anticuerpo de dominio puede dar como resultado una reducción significativa de la variante relacionada con producto. La invención incluye el tratamiento adicional de anticuerpos de dominio obtenidos a partir de la expresión en hospedadores que coexpresan una tiol isomerasa para reducir o retirar la variante relacionada con producto.

c) Adaptación de las condiciones de cultivo

En una realización adicional de la invención, que puede emplearse sola o en combinación con cualquier otra realización como se describen en la presente memoria para reducir la formación de variantes relacionadas con producto que carecen de al menos un enlace disulfuro, pueden adaptarse las condiciones de cultivo.

El especialista conoce las condiciones de cultivo estándares para hospedadores no *E. coli* adecuadas para la producción recombinante de anticuerpos de dominio. Como ejemplo específico, se cultiva típicamente la levadura *Pichia*, en particular *P. pastoris*, en lotes alimentados con glicerol y se inicia la inducción mediante la adición de metanol. El protocolo estándar es el protocolo de Invitrogen, expresión a 30 ºC en medio salino basal con una velocidad de alimentación de metanol de 10 ml/l·h. Serán conocidos por el especialista otros procedimientos de cultivo de hospedador no *E. coli* y se describen, por ejemplo, en “Methods in Molecular Biology, Pichia protocols”, segunda edición, Humana Press.

En comparación con las condiciones estándares, incluyendo pero sin limitación aquellas ejemplificadas para *P. pastoris*, pueden aplicarse una o más seleccionadas de las siguientes adaptaciones de las condiciones de cultivo: reducción de la alimentación de metanol, rebaja de la conductividad del medio de cultivo, rebaja de la temperatura de cultivo, adición de extracto de levadura y/o peptona o cualquier combinación de las mismas.

Se dará la siguiente descripción detallada en el contexto del protocolo estándar (el protocolo de Invitrogen) para cultivar *P. pastoris*, como se expone anteriormente. El especialista estará fácilmente en disposición de adaptar esta enseñanza a los protocolos estándares usados para otros hospedadores no *E. coli*. Por ejemplo, cuando la temperatura estándar para cultivar *P. pastoris* es de 30 ºC, una reducción de la temperatura de cultivo significa, p.ej. 25 ºC. Resulta evidente para el especialista que, para un hospedador no *E. coli* cuya temperatura de cultivo estándar es de 37 ºC, 32 o 30 ºC pueden representar una temperatura de cultivo reducida.

Sin querer ligarse a teoría alguna, se concibe que las condiciones de cultivo que reducen el estrés metabólico para el hospedador no *E. coli* reducirán o anularán la formación de variante relacionada con producto que carece de un enlace disulfuro.

Una posible adaptación de las condiciones de cultivo se refiere a una alimentación de metanol reducida. Es un ejemplo de una alimentación de metanol reducida una reducción de un 30, 50, 70 u 80 % en comparación con el protocolo estándar, por ejemplo ≤7 ml/l·h, ≤5 ml/l·h, ≤4 ml/l·h, ≤3 ml/l·h.

Es una adaptación adicional de las condiciones de cultivo, para aplicar sola o junto con una alimentación de metanol reducida o cualquier otra realización de la invención descrita en la presente memoria, la reducción de la conductividad del medio de cultivo, p.ej. el medio salino basal. Dicha reducción puede ser una reducción de un 30, 50, 70 u 80 % en comparación con el protocolo estándar, por ejemplo ≤28 mS/Cm, ≤20 mS/Cm, ≤12 mS/Cm.

Es una adaptación adicional de las condiciones de cultivo, para aplicar sola o junto con una o más de una alimentación de metanol reducida, una conductividad reducida y/o cualquier otra realización de la invención descrita en la presente memoria, rebajar la temperatura de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede rebajarse en 2, 3, 4, 5 o 6 ºC. En una realización preferida, la temperatura de cultivo se rebaja en 5 ºC, p.ej. de 30 a 25 ºC.

Es una adaptación adicional de las condiciones de cultivo, para aplicar sola o junto con una o más de una alimentación de metanol reducida, una conductividad reducida, rebajar la temperatura de cultivo y/o cualquier otra realización de la invención descrita en la presente memoria, la adición de extracto de levadura y/o peptona. Por ejemplo, pueden añadirse extracto de levadura y/o peptona a una concentración en la alimentación de 0 a 20 % al medio de cultivo.

Para el proceso de producción global, la adición de extracto de levadura y/o peptona tiene la ventaja adicional de reducir en gran medida, o evitar completamente, la aparición de fragmentos de anticuerpos de dominio. Esta variante estructural adicional se forma probablemente por la actividad proteolítica. Sin querer ligarse a teoría alguna, la adición de extracto de levadura y/o peptona puede proporcionar sustratos alternativos para proteasas, de tal modo que se reduzca o evite la formación de anticuerpos de dominio degradados en conjunto.

Es una adaptación adicional de las condiciones de cultivo, para aplicar sola o junto con una o más de una alimentación de metanol reducida, una conductividad reducida, rebajar la temperatura de cultivo, la adición de extracto de levadura y/o peptona y/o cualquier otra realización de la invención descrita en la presente memoria, el

uso de un medio de cultivo optimizado. Por ejemplo, en lugar de medio salino basal, puede usarse medio rico como se define en la sección experimental.

El especialista puede combinar fácilmente las medidas anteriores de tal modo que se conciban condiciones de cultivo optimizadas. El nivel de variante relacionada con producto en las diferentes condiciones puede determinarse fácilmente, p.ej., por HPLC-FI.

Las medidas anteriores, solas o en una combinación adecuada, pueden dar como resultado una reducción significativa de la variante relacionada con producto. Por ejemplo, en comparación con un protocolo estándar (p.ej. el protocolo de Invitrogen) que da como resultado un 15 % de variante relacionada con producto, las medidas anteriores pueden conducir a una reducción de entre 1 y 4 % de la variante relacionada con producto, preferiblemente 1 % de la variante relacionada con producto o menos.

d) Replegamiento en presencia de desnaturalizante y tampón rédox

Como se esboza anteriormente, la adaptación de las condiciones de cultivo puede dar como resultado una considerable reducción de la variante relacionada con producto. Sin embargo, puede seguir habiendo variante relacionada con producto residual. De forma similar, pueden haberse producido los anticuerpos de dominio por protocolos estándares o por procedimientos optimizados para titular en hospedadores no *E. coli*, y pueden comprender 15-25 % de variante relacionada con producto.

Por ello, en una realización adicional, la presente invención se refiere al replegamiento de la variante relacionada con producto en presencia de un desnaturalizante y en condiciones adecuadas para la formación del enlace o enlaces disulfuro faltantes. Esta puede aplicarse sola o junto con una o más de las demás realizaciones de la invención como se describen en la presente memoria.

Para conseguir la formación del puente disulfuro faltante, se trata ventajosamente la preparación de anticuerpo de dominio con un desnaturalizante. Esto se realizará típicamente después de la separación del hospedador, en el sobrenadante de cultivo o después de cualquiera de las diferentes etapas de purificación aplicadas rutinariamente. En una realización preferida, se aplicará este tratamiento a anticuerpo de dominio purificado. Los desnaturalizantes adecuados incluyen GdnHCl (clorhidrato de guanidinio, también abreviado como GuHCl) o urea. El desnaturalizante tiene que aplicarse a una concentración suficientemente alta para conseguir la desnaturalización parcial de la variante relacionada con producto y al mismo tiempo desplegar el anticuerpo de dominio intacto. Por ejemplo, puede emplearse GdnHCl de 0,125 a 2 M, preferiblemente 1 M, más preferiblemente GdnHCl 2 M; o urea 1-3 M, preferiblemente 2 M, más preferiblemente 3 M. El especialista conocerá otros desnaturalizantes adecuados que tienen un efecto comparable sobre la variante relacionada con producto.

Además, el replegamiento de la variante y del anticuerpo de dominio intacto tiene que efectuarse en presencia de un tampón rédox adecuado. El especialista puede seleccionar fácilmente los tampones rédox adecuados basándose en las enseñanzas de la presente solicitud. Los ejemplos específicos de tampones rédox adecuados comprenden mezclas de cistamina/cisteamina. Las relaciones adecuadas están en el intervalo de 1:5 mM/mM a 5:1 mM/mM, preferiblemente 1:5 mM/mM de cistamina/cisteamina.

En una realización preferida, se efectúa el replegamiento en GdnHCl 2 M y cistamina/cisteamina 1:5 mM/mM. En estas condiciones, puede conseguirse un replegamiento completo, la formación del enlace disulfuro faltante y el replegamiento del anticuerpo de dominio intacto en el transcurso de aproximadamente 2 h a temperatura ambiente.

El anticuerpo de dominio puede desplegarse por exposición al desnaturalizante y exponerse posteriormente al tampón rédox. Como alternativa, pueden usarse al mismo tiempo el desnaturalizante y el tampón rédox.

La exposición a desnaturalizante y tampón rédox puede conseguirse mediante técnicas estándares ejemplificadas, pero sin limitación, por adición de desnaturalizante/tampón rédox a la solución del anticuerpo de dominio para conseguir una concentración final adecuada, mediante diálisis o mediante técnicas de intercambio de tampón. La puesta en contacto con desnaturalizante y tampón rédox puede efectuarse también con los anticuerpos de dominio fijados a la fase estacionaria de una columna cromatográfica, mientras que desnaturalizante y tampón rédox son parte de la fase móvil.

Posteriormente al replegamiento, puede transferirse el anticuerpo de dominio a un nuevo sistema tampón, si se desea. La transferencia puede lograrse por medios rutinarios. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio puede transferirse a PBS por diálisis. El especialista puede elegir fácilmente otros sistemas tampón adecuados.

e) Oxigenación, aumento de temperatura, aumento del pH, alta presión

Después de la separación del anticuerpo de dominio del hospedador, puede tratarse el anticuerpo de dominio de varios modos que aumentan la formación de puentes disulfuro.

La solución de anticuerpo de dominio puede oxigenarse. Por ejemplo, la solución puede purgarse con gas oxígeno. Como alternativa, pueden añadirse compuestos que liberan oxígeno. Los compuestos adecuados son conocidos por el especialista. Se necesita una cantidad de oxígeno soluble en la solución para mantener la forma totalmente oxidada del anticuerpo de dominio, no se preferirá el agotamiento de la cantidad de suministro de oxígeno a la solución, por ejemplo por una cubierta de gas nitrógeno durante el proceso de llenado.

La oxigenación puede efectuarse a una temperatura adecuada, p.ej. entre temperatura ambiente y 70 ºC, preferiblemente entre 37 y 60 ºC, ventajosamente a 55 ºC. Mientras que la oxigenación sola puede conducir a la reducción de la variante relacionada con producto, la combinación de oxigenación y temperatura aumentada aumentará la velocidad a la que se forman el puente o puentes disulfuro faltantes.

La duración del tratamiento puede elegirse según sea apropiado, p.ej. entre 2 horas y 48 horas, ventajosamente 3-24 h, preferiblemente de 5 a 12 h. El especialista puede monitorizar la progresión de la formación de puente disulfuro, p.ej. por HPLC-FI, para determinar la duración de tratamiento adecuada.

El sistema tampón no está limitado, a condición de que sea adecuado para oxigenación. Pueden usarse sistemas tampón estándares como PBS o Tris-HCl.

Como alternativa a la oxigenación, pueden tratarse los anticuerpos de dominio aumentando la temperatura solo, concretamente sin oxigenación. Aumentar la temperatura, p.ej. a 70 ºC, preferiblemente a 40-60 ºC, más preferiblemente a 55 ºC, dará como resultado la reducción de la variante relacionada con producto mediante la formación del puente o puentes disulfuro faltantes.

La duración del tratamiento puede elegirse según sea apropiado y puede oscilar de varios días a varias semanas, por ejemplo de 2 a 4 semanas a 37 ºC. A mayores temperaturas, puede reducirse la duración del tratamiento. Puede observarse una reducción de la variante relacionada con producto, por ejemplo, después de tratar el anticuerpo de dominio a 50 ºC durante una noche, preferiblemente 1 a 2 días, preferiblemente 3 a 7 días.

Las medidas anteriores de oxigenación y/o aumento de temperatura pueden combinarse además con el aumento del pH. Son ejemplos de pH aumentado, p.ej., en el intervalo de pH 7,5 a 10, más específicamente aproximadamente pH 8 o 9. Dicho aumento del pH conducirá también a la reducción de las variantes relacionadas con producto por sí mismo, concretamente sin combinación con oxigenación y/o temperatura aumentada.

Como alternativa a la oxigenación, aumento de temperatura, aumento del pH y/o además de estas medidas, los anticuerpos de dominio pueden someterse a alta presión. Aumentar la presión a 25-1000 MPa, preferiblemente 50-500 MPa, tal como 100-400 MPa, p.ej. aproximadamente de 100 a aproximadamente 200 MPa, dará como resultado la reducción de la variante relacionada con producto mediante la formación del puente o puentes disulfuro faltantes.

La duración del tratamiento puede elegirse según sea apropiado y puede oscilar de una o pocas horas a 50 horas, por ejemplo aproximadamente 20-25 horas a temperatura ambiente.

Puede apreciarse que las combinaciones de una o más de las medidas de oxigenación, temperatura aumentada, pH aumentado y alta presión potenciarán la formación del puente o puentes disulfuro en la variante relacionada con producto, de tal modo que la variante se reduzca más rápidamente y/o en mayor extensión.

Pueden aplicarse también una o más de las medidas anteriores a los anticuerpos de dominio fijados a una fase estacionaria de una columna cromatográfica como se describe en la presente memoria.

f) Retirada de variante relacionada con producto mediante unión a tiol-Sepharose activada y/o HPLC-FI

Las medidas descritas anteriormente, solas o en combinación, aspiran a reducir la variante relacionada con producto formando el puente o puentes disulfuro faltantes. En otras palabras, estas medidas conducen a la conversión de la variante relacionada con producto en el producto deseado. Las ventajas son obvias, porque puede estar presente una proporción significativa de material de partida en forma de variante, y la conversión en el producto deseado aumenta el rendimiento del proceso global.

No obstante, en una realización adicional que puede usarse sola o en combinación con una o más de las medidas o tratamientos anteriores, la presente invención se refiere también a la retirada de la variante relacionada con producto. En este contexto, retirada significa la separación física del producto deseado, y es distinto de la conversión de la variante en el producto deseado mediante la formación del puente o puentes disulfuro faltantes.

El especialista puede utilizar una serie de técnicas estándares para retirar la variante relacionada con producto en virtud de la presencia de grupos tiol libres que están presentes en la variante en vista de la falta del puente o puentes disulfuro. Estos grupos tiol libres pueden usarse para unir la variante a grupos reactivos que están, por ejemplo, inmovilizados sobre un portador adecuado. Son un ejemplo de grupos reactivos adecuados los grupos tiol. Por tanto, puede usarse tiol inmovilizado en un portador, p.ej. un sustrato adecuado para cromatografía, para unirse

al tiol libre en la variante. Pueden usarse técnicas estándares que comprenden, pero sin limitación, cromatografía, para separar la forma variante unida del producto deseado.

Los grupos tiol libre pueden usarse para la separación de la variante relacionada con producto en el caso de que el anticuerpo de dominio deseado no contenga grupos tiol libres una vez se han formado todos los puentes disulfuro. Por ejemplo, si el anticuerpo de dominio contiene una o más cisteínas que no participan en la formación de puente disulfuro en el producto deseado, la unión a grupos tiol no distinguirá entre el producto y la variante relacionada con producto.

Preferiblemente, los anticuerpos de dominio se exponen a los grupos reactivos en condiciones desnaturalizantes. Esto asegura que todos los tioles libres presentes en la variante relacionada con producto serán accesibles a los grupos reactivos. Pueden emplearse condiciones desnaturalizantes como se ejemplifica en el contexto de la estrategia de replegamiento (desnaturalizante + tampón rédox), aunque con omisión del tampón rédox. Los ejemplos incluyen clorhidrato de guanidinio y urea a las concentraciones especificadas anteriormente en la presente memoria. Además, pueden aplicarse condiciones como se usan en la sección de ejemplos (p.ej. urea 6 M).

Un enfoque adicional para retirar la variante relacionada con producto según la presente invención reside en el uso de HPLC-FI. Entre los varios procedimientos cromatográficos discutidos en la parte experimental de esta solicitud, la HPLC-FI ha mostrado sorprendentemente tener una buena resolución para el anticuerpo de dominio deseado y la variante relacionada con producto. Por ello, la HPLC-FI puede usarse no solo para monitorizar los efectos de diversos tratamientos según la presente invención, sino para evaluar la calidad de un producto anticuerpo de dominio en términos de homogeneidad de producto. Además, la HPLC-FI puede usarse para la separación física de la variante del producto deseado.

La retirada de la variante relacionada con producto por separación física del anticuerpo de dominio deseado puede efectuarse sola, o en combinación con cualquiera de las demás realizaciones de la invención, como se describe en la presente memoria. Ventajosamente, en el caso de una combinación, se efectuarán primero uno o más procedimientos o tratamientos que reduzcan la cantidad de variante relacionada con producto mediante la formación del puente o puentes disulfuro faltantes, seguido de una etapa de retirada de la variante restante por separación física.

Anticuerpo de dominio de la invención

La solicitud da a conocer también el anticuerpo de dominio obtenible mediante los procedimientos de la invención como se describen en la presente memoria. Se caracteriza por un nivel reducido, o la ausencia completa, de la variante relacionada con producto que carece de al menos un puente disulfuro. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio obtenible mediante los procedimientos de la presente invención comprende un 0-5 %, más preferiblemente un 0-4 %, 0-3 %, 0-2 % o 0-1 % de variante relacionada con producto. Lo más preferiblemente, el anticuerpo de dominio de la presente invención estará libre de la variante relacionada con producto. El especialista puede determinar fácilmente la proporción de variante relacionada con producto como un porcentaje del total, p.ej. por HPLC-FI como se describe en la presente memoria.

En otras palabras, el anticuerpo de dominio obtenible mediante los procedimientos de la presente invención se caracteriza por una homogeneidad estructural mejorada en comparación con preparaciones de la técnica anterior. En particular, las preparaciones de la técnica anterior pueden comprender un 15-25 %, o incluso proporciones mayores, de variante relacionada con producto.

En vista de la homogeneidad estructural mejorada, el anticuerpo de dominio obtenible mediante el procedimiento de la presente invención es ventajoso en comparación con preparaciones de la técnica anterior. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio de la presente invención es ventajoso para aplicaciones terapéuticas. Con relación al uso de anticuerpo terapéutico, la homogeneidad estructural es de la mayor importancia clínica y reguladora. Aunque sorprendentemente la variante relacionada con producto sea totalmente funcional, su presencia en preparaciones terapéuticas es indeseada.

Por consiguiente, la solicitud da a conocer también preparaciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden el anticuerpo de dominio obtenible mediante los procedimientos de la presente invención. La solicitud da a conocer también el uso médico del anticuerpo de dominio obtenible mediante el procedimiento de la presente invención.

El especialista puede formular fácilmente formulaciones farmacéuticamente adecuadas basándose en el conocimiento general común. Además, se hace referencia explícita a las referencias que tratan específicamente los anticuerpos de dominio que se citan en la presente memoria. Sin limitación, pueden prepararse formulaciones para vías estándares de aplicación, incluyendo formulaciones para aplicación nasal, oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravaginal, rectal, aplicación tópica o aplicación por inhalación.

Basándose en la presente invención, el especialista puede idear también fácilmente procedimientos adecuados de

tratamiento caracterizados por el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de dominio de la presente invención.

EJEMPLOS

La sección experimental describe la sorprendente identificación de una variante relacionada con producto que aparece tras la expresión de anticuerpos de dominio único, como nanocuerpos, en hospedadores no *E. coli* tales como *Pichia pastoris*. Se describe también el análisis y eliminación de la variante relacionada con producto.

La variante no aparece en *E. coli*.

Varios procedimientos cromatográficos estándares no pueden separar el material “intacto” de la variante: ni una etapa cromatográfica de intercambio iónico catiónico (IEX), ni una cromatografía de interacción hidrófoba mostraron capacidad de resolución para la variante. Además, la mayoría de las variantes son totalmente funcionales como se determina por la unión (p.ej. Biacore, ELISA) a sus ligandos respectivos. En otras palabras, mediante técnicas analíticas estándares, el material producido no en *E. coli* (que comprende la variante) era indistinguible del material producido en *E. coli* (sin la variante).

Por estas razones, encontrar la variante relacionada con producto fue sorprendente, para empezar.

El análisis de la variante relacionada con producto demuestra que la variante, que se identificó inicialmente como “postpico” en el análisis de HPLC-FI, constituye una población de moléculas de nanocuerpos en que uno de los enlaces disulfuro canónicos no se ha formado. En un caso, el enlace disulfuro no se ha formado en uno de los bloques de construcción del nanocuerpo de un nanocuerpo compuesto que comprende tres subunidades de nanocuerpo con dos especificidades diferentes. La evidencia de que la variante relacionada con producto carece de un enlace disulfuro provino de las medidas de masa total por espectrometría de masas, la medida del tiol libre en la muestra, la unión de la variante a una resina de afinidad de tiol y la formación espontánea del enlace disulfuro en la variante tras almacenamiento.

Se ejemplifican múltiples modos para evitar la aparición de la variante para empezar y/o para retirar la variante después de que se haya formado.

Por ejemplo, la formación de la variante durante la etapa de cultivo puede reducirse o evitarse mediante una o más medidas seleccionadas de baja alimentación de metanol, medio de baja conductividad, baja temperatura de cultivo, adición de extracto de levadura y/o peptona y sobreexpresión de proteína disulfuro isomerasa (PDI).

Además, la variante puede retirarse del producto obtenido mediante uno o más seleccionados de unión a tiol-Sepharose en condiciones desnaturalizantes, HPLC-FI, almacenamiento a temperaturas elevadas, oxigenación, aumento del pH, replegamiento en presencia de desnaturalizantes y un tampón rédox y adición de agentes oxidantes tales como iones metálicos oxidantes, específicamente Cu2-, Fe2+, Fe3+ y/o Zn2+.

La adición de agentes oxidantes, en particular iones metálicos oxidantes, p.ej. iones de cobre, hierro o cinc, puede efectuarse en cualquier etapa de producción, concretamente durante la etapa de cultivo, durante las diversas etapas de clarificación y purificación y en el producto purificado final.

Estas medidas, solas o en combinación, evitan tener una gran proporción de variante de producto activa, pero potencialmente inestable, en la sustancia farmacológica final después de la purificación.

RANKL008a se ha descrito anteriormente en el documento WO 2008/142164 y es un nanocuerpo biespecífico trivalente consistente en tres dominios variable humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada, del que dos subunidades idénticas son específicas para unión a RANKL, mientras que la subunidad restante se une a seroalbúmina humana (HSA). Las subunidades se condensan de cabeza a cola con un ligador G/S en el siguiente formato: 13H5-9GS-Alb8-9GS-13H5 y tienen la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 6):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSE
VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT
ISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYL
QMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSS

En algunos casos, RANKL008a es seguido por el acrónimo Pic, que representa la proteína que se expresa en *Pichia pastoris*, o por el acrónimo Omp, que representa el material expresado en *E. coli* mediante expresión periplásmica.

Está demostrado que el material que contiene variantes relacionadas con producto, p.ej., de RANKL008a, (se hace referencia también a la variante que carece de uno o dos puentes disulfuro como RANKL008a-PRV-SS o PRV-RANKL008a) sorprendentemente no muestra una potencia reducida; la unión a ambos ligandos, concretamente RANKL y seroalbúmina humana, sorprendentemente no está perjudicada y la variante es totalmente funcional. Además, se presentan evidencias de que el enlace disulfuro falta en la subunidad de unión a RANKL de este nanocuerpo biespecífico (por unión a RANKL y HSA) trivalente.

La molécula de RANKL008a se produjo mediante expresión periplásmica en *E. coli* o en *Pichia pastoris* (secretada). Mientras que todas las metodologías analíticas y medidas de potencia demostraron que los materiales de *E. coli* y *P. pastoris* no eran significativamente diferentes, la HPLC-FI mostró la presencia de una variante cuantitativamente importante que carece de un puente disulfuro en el material derivado de *Pichia*.

Se demuestra que la aparición de la variante RANKL008a-PRV-SS es independiente de la cepa de levadura en que se expresa el constructo, y no pudieron identificarse diferencias entre los diferentes clones de producción seleccionados. Además, la variante está ya presente en las fases iniciales de expresión y no hay un aumento relativo durante el transcurso de la expresión. Hay, sin embargo, una clara correlación entre la eficacia de expresión, el título final obtenido y la estrategia de alimentación aplicada (alimentación de metanol en particular), y la proporción relativa de esta variante que es tal que cuanto mayor es la expresión, mayor es la proporción relativa de la variante.

El replegamiento en presencia de desnaturalizante y tampón rédox mostró claramente que la variante puede convertirse en material intacto que contiene el puente disulfuro canónico esperado. Se muestra también que, al aumentar la temperatura, cambiar el pH y añadir agentes oxidantes como iones metálicos, la variante podía convertirse eficaz y reproduciblemente en proteína intacta. Se muestra además que dichas medidas pueden tomarse en diferentes etapas del proceso: en el caldo de cultivo, sobrenadante clarificado o en materiales purificados, como se ejemplifica mediante la adición de un agente oxidante, específicamente un ión metálico, más específicamente $CuSO_4$.

En una realización preferible, se define un proceso en que se añade un ión metálico oxidante, preferiblemente Cu2+, más preferiblemente $CuSO_4$ 1 mM, al sobrenadante de cultivo clarificado antes de la carga en la primera etapa cromatográfica.

En esta sección, se describen experimentos, entre otros, que se efectuaron para crear otros hospedadores para la expresión de RANKL008a y su efecto sobre PRV-RANKL008a. Además, para una cepa particular, se ensayó si PRV-RANKL008a está presente en todos los clones aislados. Se exploró la sobreexpresión de proteína disulfuro isomerasa (PDI) con el fin de “facilitar” la formación de enlace disulfuro durante la expresión con el fin de reducir la proporción relativa de la variante.

Además, se exploraron las condiciones de fermentación para la expresión de RANKL008a en *P. pastoris* cepa X-33 con el fin de investigar si algunas de estas condiciones pueden reducir la proporción relativa de esta variante.

A menos que se describan de otro modo, se aplicaron los procedimientos de análisis estándares.

Ejemplo 1: La producción fermentativa de nanocuerpos en *P. pastoris* da como resultado un producto homogéneo de alta calidad

Se ha descrito extensamente la producción de nanocuerpos en hospedadores eucarióticos inferiores tales como *Pichia pastoris* en el documento WO 94/25591, y es conocido que da como resultado un producto de buena calidad.

Por consiguiente, la comparación del material RANKL008a expresado en *E. coli* frente a los materiales expresados en *P. pastoris* (cepa X-33) no reveló ninguna diferencia significativa como puede apreciarse en las Figuras 1 a 3.

El material usado para comparación se purificó como se expone brevemente a continuación: se purifica la proteína RANKL008a a partir de sobrenadante clarificado (obtenido por centrifugación) mediante captura sobre una resina de proteína A; seguido de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico en Source 15S y posteriormente se refinó en una etapa de SEC en Superdex 75.

La Figura 1 describe la cromatografía de exclusión por tamaño en material de *E. coli* (dos lotes diferentes designados como "B5#201207" y "B11#140208") en comparación con material de *P. pastoris* ("Pic P#270308").

Como puede observarse en particular por el inserto ampliado, el material producido y purificado a partir de una fermentación de *P. pastoris* (al que se hace referencia también como “material de *P. pastoris*”) usando protocolos de purificación similares, daba como resultado un material aún más homogéneo en comparación con *E. coli.* El material de *P. pastoris* eluía en un pico sin ningún prepico o postpico. La cola del pico eluido era muy pequeña, y mucho menor que la observada para el material comparable obtenido a partir de *E. coli.*

Los descubrimientos cromatográficos de exclusión por tamaño pudieron confirmarse mediante la comparación de

nanocuerpos producidos en *E. coli* y *P. pastoris* mediante HPLC de intercambio iónico (intercambio catiónico). Los resultados pueden observarse en la Fig. 2 y la ampliación en la Fig. 3. En ambas figuras, *P. pastoris* producía trazos de nanocuerpo que pueden identificarse con el término "Pic". Los demás lotes están producidos en *E. coli*. En los nanocuerpos producidos en *P. pastoris*, el pico a 27 min observado para los dos lotes diferentes de material de *E. coli* estaba ausente, indicando de nuevo una mejor homogeneidad del material producido por *P. pastoris*.

Ejemplo 2: Los nanocuerpos producidos en *P. pastoris* tienen una buena funcionalidad como se ejemplifica por la unión a RANKL o HSA mediante RANKL008a (sin diferencias con el material producido por *E. coli*)

RANKL008a se une tanto a RANKL como a HSA y por lo tanto deberían ensayarse ambas funcionalidades para comparar el material producido por *E. coli* y *P. pastoris*. Puede ensayarse la funcionalidad de RANKL008a mediante varias metodologías: p.ej. se usó un procedimiento de Biacore para unión a RANKL y HSA, para permitir un cribado acelerado de la funcionalidad de unión de RANKL008a a sus dianas respectivas. Se usan las comparaciones de las pendientes de unión para comparación relativa. Además, se usaron ensayos ELISA para monitorizar las potencias relativas por RANKL y HSA.

Experimentos de Biacore para unión de RANKL008a a RANKL o HSA

Se efectúan los experimentos en un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Se recubren los chips con HSA o RANKL usando el kit de acoplamiento amino de Biacore, usando NHS/EDC para activación y etanolamina para desactivación. Se recubrieron los chips CM5 (Biacore AB, pureza de investigación) respectivamente con HSA 10 µg/ml (Sigma A3782 / 085K7541) o RANKL 7 µg/ml (Peprotech nº de cat. 310-01 lote nº 1101142) en tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,5. Se resumen las condiciones experimentales en la siguiente tabla:

	RANKL	HSA
Tampón de flujo	HBS-EP*	HBS-EP*
Caudal (µl/min)	45	45
Volumen de inyección (µl)	90	90
Tiempo de inyección (s)	120	120
Tiempo de disociación (s)	180	180
Solución de regeneración	H_3PO_4 0,1 M	Glicina-HCl 10 mM a pH 1,5
Caudal de regeneración (µl/min)	100	100
Volumen de regeneración (µl)	3	15
Tiempo de regeneración (s)	3	10

Tabla 1: Condiciones experimentales para los experimentos de Biacore
* HBS-EP: HEPES 0,01 M pH 7,4 + NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y 0,005 % de tensioactivo P20.

Se efectúa la evaluación usando el software BIAevaluation. Se determinan las pendientes usando el procedimiento de "ajuste general" y el modelo de ajuste lineal. Se determinó la velocidad de unión inicial (VUI) en la pendiente entre 5 y 30 s. Se usa RANKL008a a 5 nM en el chip de HSA y a 2 nM en el chip de RANKL; las unidades de respuesta en el chip de HSA son de aproximadamente 5200, para el chip de RANKL de aproximadamente 1700.

Se pasaron dos lotes diferentes de RANKL008a (uno producido en *E. coli* B11#140208 y otro producido en *P. pastoris* P#270308nr1) sobre un chip de HSA de alta densidad a concentraciones de 4,5 y 5 nM y se determinaron las pendientes de la unión entre 5 y 30 s. En estas condiciones y concentraciones, la unión es lineal.

	nM	Pendiente 1	Pendiente 2	Pendiente 3	Pendiente media	% de CV de la pendiente	% de unión comparado con la solución 5 M
RANKL008a de *E. coli*	4,5	2,75	2,68	2,73	2,72	1,33	92,00
	5	2,97	2,94	2,96	2,96	0,52	
RANKL008a de *P. pastoris*	4,5	2,9	2,97	2,84	2,90	2,24	89,33
	5	3,23	3,26	3,26	3,25	0,53	

Tabla 2: Pendientes de la unión de dos lotes de RANK-008a diferentes sobre un chip de HSA de alta densidad respectivamente a 4,5 y 5 nM (tres diluciones independientes del material madre).

El % de CV de las pendientes medidas es < 2,5 %; indicando que puede detectarse un 10 % de diferencia usando este análisis. Las pendientes medidas para una solución 4,5 nM y 5 nM son significativamente diferentes.

Al mismo tiempo, estos datos permiten comparar las pendientes de las curvas de unión para el material de *E. coli* y el material de *P. pastoris*, que tienen una unión porcentual relativa de 107 y 110 % respecto a la del lote de *E. coli* para los experimentos a 4,5 y 5 nM, respectivamente. Esta diferencia puede atribuirse a diferencias en la concentración de proteína usada para la preparación del material diluido.

En conclusión, estos datos muestran que la unión de RANKL008a producido en ambos sistemas de expresión con un chip de HSA de alta densidad era comparable.

Se pasaron dos lotes diferentes de RANKL008a (uno producido en *E. coli* B11#140208 y otro producido en *P. pastoris* P#270308nrl) sobre un chip de RANKL a concentraciones de 1,8 y 2 nM, y se determinaron las pendientes de la unión entre 5 y 30 s. En estas condiciones y concentraciones, la unión es lineal.

	nM	Pendiente 1	Pendiente 2	Pendiente 3	Pendiente 4	Pendiente 5	Pendiente media	% de CV en la pendiente	% de unión en comparación con solución 2 M
RANKL008a en *E. coli*	1,8	1,6	1,62	1,64	1,6	1,6	1,61	1,11	92,22
	2	1,74	1,75	1,72	1,77	1,76	1,75	1,10	
RANL008a en P. pastoris	1,8	1,74	1,72	1,72	1,69	1,72	1,72	1,04	90,33
	2	1,91	1,9	1,9	1,89	1,91	1,90	0,44	

Tabla 3: Pendientes de la unión de dos lotes de RANKL008a diferentes a un chip de RANKL respectivamente a 1,8 y 2 nM (5 diluciones independientes de la solución madre).

El % de CV de las pendientes determinado para la unión de RANKL008a a RANKL es bajo (% CV < 1,2 %), de tal modo que puede detectarse una diferencia de 10 % usando esta técnica. Las pendientes medidas para una solución de 1,8 nM y 2 nM son por lo tanto significativamente diferentes.

Al mismo tiempo, estos datos permiten comparar las pendientes de las curvas de unión para el material de *E. coli* y el material de *P. pastoris*, que tienen una unión porcentual relativa de 109 y 111 % respecto a la del lote de *E. coli* para los experimentos de 1,8 y 2 nM, respectivamente. La diferencia puede atribuirse a diferencias en la concentración de proteína usada para la preparación del material diluido.

Puede concluirse que la unión de RANKL al material RANKL008a producido en ambos sistemas de expresión es comparable.

ELISA

El ensayo ELISA de potencia para la unión de RANKL es un ensayo de tipo inhibición. Brevemente, RANKL008a interacciona con el ligando de receptor activador del factor nuclear κB (RANKL) soluble humano y bloquea la interacción de este ligando con su receptor activador humano de factor nuclear κB (RANK), impidiendo así la señalización a través de este receptor. En el ensayo, se preincuba RANKL008a con una cantidad fija de RANKL y RANK-Fc y se incuba entonces la mezcla en una placa ELISA recubierta con nanocuerpo anti-Fc, uniéndose cualquier RANKL residual no unido a RANKL008a al RANK-Fc inmovilizado sobre la placa. Se detecta la señal incubando con un anticuerpo anti-RANKL biotinilado que se detecta por estreptavidina acoplada con HRP (peroxidasa de rábano picante). Este ensayo es capaz de demostrar la ávida unión de las subunidades 13H5 a RANKL y mostrará si alguno de los bloques 13H5 no es funcional.

La ELISA desarrollada para unión a HSA está basada en la unión directa de RANKL008a a HSA recubierta sobre la placa, detectándose cualquier RANKL008a unido usando un anti-nanocuerpo-nanocuerpo marcado con HRP. Este ensayo puede detectar si se perjudica la unión a HSA. Las potencias medidas en ambos ensayos ELISA se expresan como potencias relativas en comparación con el material de referencia.

Para RANKL008a, se han efectuado tanto el ensayo de inhibición de RANKL como el ensayo de unión a HSA con el lote P#080408nr2 (producido en *P. pastoris*) y se han comparado con las potencias del lote de RANKL008a purificado a partir de expresión en *E. coli* (B11#140208nr1). En la Tabla 4a, se encontró que eran comparables las potencias relativas de ambos materiales (múltiples análisis en diferentes días). Los datos de unión a HSA representados en la Tabla 4b n son tampoco significativamente diferentes entre dos muestras.

Tabla 4a		Inhibición de RANKL			
Datos del ensayo	ID de muestra	Potencia relativa	LI	LS	% de IC relativo
1	P#080408 nr2	0,810	0,769	0,853	10,4
2	P#080408 nr2	0,826	0,762	0,894	16,0
3	P#080408 nr2	0,884	0,813	0,962	16,9
4	B11#140208 nr1	0,899	0,831	0,972	15,7
5	B11#140208 nr1	0,827	0,789	0,867	9,4
6	B11#140208 nr1	0,791	0,729	0,858	16,3
7	B11#140208 nr1	0,795	0,740	0,853	14,2
8	B11#140208 nr1	0,728	0,675	0,875	15,1

Tabla 4b		Inhibición de RANKL			
Datos del ensayo	ID de muestra	Potencia relativa	LI	LS	% de IC relativo
1	P#080408 nr2	0,809	0,773	0,847	9,1
2	P#080408 nr2	0,786	0,743	0,832	11,3
3	P#080408 nr2	0,853	0,816	0,891	8,8
4	B11#140208 nr1	1,003	0,940	1,070	13,0
5	B11#140208 nr1	0,937	0,883	0,995	12,0
6	B11#140208 nr1	0,891	0,820	0,968	16,6
7	B11#140208 nr1	0,969	0,909	1,032	12,6
8	B11#140208 nr1	0,907	0,845	0,973	14,2

Tabla 4: Potencias relativas de RANKL008a (lote de *E. coli* B11#140208) en comparación con RANKL008a (lote P#080408nr2) expresado en *P. pastoris* en la ELISA de unión a RANKL y la ELISA de unión a HSA. Con LI el límite inferior y LS el límite superior del intervalo de confianza del 95 %.

Ejemplo 3: El análisis por HPLC-FI reveló sorprendentemente la presencia de una variante relacionada con producto en material producido en *P. pastoris*

Como se esboza anteriormente, el material producido en *P. pastoris* se caracterizaba por una igual funcionalidad y una homogeneidad aún mayor en comparación con el material producido por *E. coli*.

Fue por lo tanto altamente sorprendente encontrar una variante relacionada con producto en material producido en *P. pastoris* tras análisis por HPLC-FI (Figura 4). Se efectuó la HPLC-FI en las siguientes condiciones:

Columna: Columna 300SB_C3 4,6 x 150 mm de Agilent ref. 883995-909 funcionando a 75 ºC
Tampón A: agua + 0,1 % de TFA
Tampón B: 49,95 % de acetonitrilo + 49,95 % de isopropanol + 0,1% de TFA
Gradiente: véase la tabla siguiente

Tabla de gradiente usado en el procedimiento de HPLC-FI.

Tiempo (min)	**Fase móvil B (%)**
0	10
2,5	1,0
3	27,5
30	36,5
30,5	95
33	95
33,1	10
36	10

El funcionamiento puede monitorizarse, p.ej., por detección UV a 214 y/o 280nm, como se indica. En el cromatograma, apareció un postpico pronunciado y significativo a aproximadamente 20,5 minutos de tiempo de retención en material producido por *P. pastoris* ("Pic P#2703083.3"). En comparación, no se observó dicho pico en material producido por *E. coli* ("B11#1402083.83"). Se hace referencia también al material del postpico como “variante relacionada con producto”, abreviada como “PRV”. A veces, se hace referencia también a la variante relacionada con producto de RANKL008a como "PRV-RANKL008a".

Debería observarse que, entre los diferentes análisis efectuados, puede haber una ligera diferencia en el tiempo de retención absoluto del pico principal. Sin embargo, la distancia entre el pico principal y el postpico es siempre constante y por tanto sirve como identificación. Estas diferencias son debidas a pequeñas diferencias en la preparación de tampón.

Para caracterizar adicionalmente la naturaleza de esta variante relacionada con producto, se analizó el material por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas por electropulverización (CL-EM).

Se sometió el material analizado en la Figura 4 a un análisis de CL-EM en un espectrómetro de masas por electropulverización Waters Q-Tof Ultima acoplado directamente con un Bioseparations Module (HPLC, Waters) en el que se efectuó un análisis de HPLC-FI. Se deconvolucionaron los espectros de masa total usando el software MaxEnt (Waters), y se demuestra que el pico principal en HPLD-FI corresponde a una masa de 40.943,01 (10 ppm de exactitud), mientras que el postpico que supone aproximadamente un 10 % de la señal tiene una masa que es aproximadamente 2 Da mayor. La masa teórica de RANKL008a es de 40.943,42 Da.

Por tanto, el pico principal mostrado en la Fig. 4 tiene la masa esperada para RANKL008a. El postpico (postpico de 10 % en el cromatograma) corresponde a una masa de 40.945,52, que corresponde a una masa de +2,1 frente a la masa teórica, confirmando que la diferencia de masa entre el pico principal y el postpico es de 2 Da.

La medida de masa total por IEP-EM revela una diferencia de masa de +2 Da para el postpico. La naturaleza exacta de este postpico era desconocida en esa etapa, pueden formularse diferentes hipótesis:

No se ha formado uno de los enlaces disulfuro canónicos en una de las subunidades de RANKL008a, por lo tanto la masa observada es de + 2 Da (dos hidrógenos extra).

Algunas sustituciones aminoacídicas pueden conducir a una diferencia de masa de 2 Da, por ejemplo una sustitución de treonina por cisteína o ácido aspártico por leucina podría conducir a una diferencia de masa de 2. Sin embargo, se verificó la secuencia de ADN del gen de RANKL008a y se encontró que era correcta. Como alternativa, podrían haber aparecido dos sitios de desamidación (conduciendo cada uno a una diferencia de masa de +1 Da).

Se emprendió el análisis adicional del postpico para elucidar su naturaleza.

Ejemplo 4: La variante relacionada con producto (postpico) contiene tiol libre

Debido a que la determinación de la masa total descrita anteriormente no puede describir inequívocamente la naturaleza de la diferencia de masa + 2Da, se exploró la hipótesis del puente disulfuro canónico no formado midiendo directamente la cantidad de tiol libre en la muestra de proteína. En RANKL008a, no están presentes grupos tiol libres y los dos residuos de cisteína presentes en cada subunidad de nanocuerpo están ligados normalmente en un enlace disulfuro.

Se efectuó la cuantificación del tiol libre usando el kit de cuantificación de tiol y sulfuro de Molecular Probes (Molecular Probes T-6060, “Thiol and sulfide quantitation kit”). Se prepararon y manejaron todos los reactivos como se describe en el manual del “Thiol and sulfide quantification kit". Se prepara la curva patrón entre 0,2 y 1,4 µM y se diluyen las muestras para entrar en la porción lineal de la curva patrón, preferiblemente en dos o tres posiciones en la parte lineal de la curva.

En este ensayo, se hizo una comparación directa de RANKL008a expresado en *E. coli* con RANKL008a expresado en *Pichia pastoris*.

Se desnaturalizaron las muestras para permitir el acceso total a los grupos tiol libres en la proteína usando clorhidrato de guanidinio 6 M (GuHCl) añadido como sal sólida. Las concentraciones finales fueron: RANKL008a de *E. coli*: 53,85 µM; RANKL008a de *P. pastoris*: 46,40 µM.

Se muestran los resultados de la cuantificación de tiol en la siguiente tabla:

Pichia	RANKL008a µM	DO405 nm	Tiol µM	**Tiol libre por molécula**
Dilución 1	2,472	0,369	0,974	0,394
Dilución 2	1,673	0,305	0,705	0,421
Dilución 3	0,799	0,209	0,301	0,376
				Media: 0,397
E. coli				
Dilución 1	2,872	0,184	0,195	0,068
Dilución 2	1,943	0,164	0,111	0,057
Dilución 3	0,929	0,158	0,086	0,092
				Media: 0,073

Tabla 5: Resultados para la cuantificación de tiol en muestras de RANKL008a expresado en *E. coli* o en *Pichia pastoris*.

Usando el "Thiol and sulfide quantitation kit" de Molecular Probes, se determinó que el índice medio de tioles libres por molécula de RANKL008a producida en *P. pastoris* era de 0,357, mientras que para RANKL008a producido en *E. coli*, el valor medido era de 0,073.

El lote producido en *P. pastoris* usado para la determinación de los tioles libres se analizó por HPLC-FI. El pico principal ascendía al 84,1 % del área de pico total, el postpico daba cuenta del 10,9 % del área de pico total y se asume que consiste en RANKL008a con un puente disulfuro faltante. Si es este realmente el caso, se esperarían 0,218 tioles libres/molécula de RANKL008a en este lote (2 tioles/molécula x 10,9 %).

El postpico estaba seguido por un postpico adicional menor que daba cuenta del 5 % del área de pico total. Suponiendo que estos representan la población de RANKL008a carente de un disulfuro en cada uno de sus subdominios 13H5, esto daría como resultado una media de 0,418 tioles libres/molécula ((2 tioles/molécula x 10,9 %) + (4 tioles/molécula x 5 %)). El valor medido de 0,397 corresponde muy estrechamente a este cálculo y, por lo tanto, se concluyó que la variante relacionada con producto de respectivamente 10,5 % y 5 % representa una población de RANKL008a en que no se han formado uno o dos enlace disulfuro.

Ejemplo 5: La variante relacionada con producto se une a tiol-Sepharose activada

Si la preparación de RANKL008a producido en *P. pastoris* contiene realmente una subpoblación en que el enlace disulfuro no se ha formado, esta población debería unirse a una columna de tiol-Sepharose 4B activada. La unión a la columna se efectúa en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de urea para apreciar en cuál medida necesita desplegarse la proteína para permitir el acceso a la cisteína desapareada. Se verifica en el material la presencia de RANKL008a-PRV analizando la muestra por HPLC-FI después de unión a resina de afinidad.

Se diluyeron las muestras de RANK008a de expresión en *P. pastoris* en D-PBS + EDTA 1 nM (pH 7,0) en presencia de urea 6 M. Se incubaron las muestras con una cantidad en exceso de gel lavado durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eluyeron por lotes las muestras y se analizó el flujo a través de las diferentes muestras por análisis de HPCL-FI.

A partir de la Figura 5, resulta evidente que si RANKL008a se despliega completamente por urea 6 M y se somete a incubación con la resina de tiol-Sepharose, el pico de variante relacionada con producto que eluye a 19,5 minutos en el cromatograma de HPLC-FI ha desaparecido ahora completamente, corroborando el descubrimiento de que el pico que eluye después del pico principal en el cromatograma representa el material que contiene tioles libres capaces de unirse a la resina de afinidad de tiol. Debido a que RANKL008a no contiene otras cisteínas libres en su secuencia, estos datos respaldan el descubrimiento de los tioles libres.

Ejemplo 6: Efecto del almacenamiento sobre la estabilidad de PRV-RANL008a

Se sometió RANKL008a producido en *P. pastoris* a ensayo de estabilidad poniendo la solución estéril en viales cerrados a 37 ºC durante 2 a 4 semanas. Se monitorizó el cromatograma de HPLC-FI para detectar cualquier cambio ocurrido durante la condición de estrés de almacenamiento acelerado.

La Figura 6 ilustra que la variante relacionada con producto con enlace disulfuro faltante (pico que eluye a 19,5 min) disminuye después del almacenamiento a altas temperaturas; el efecto es ya visible después de 2 semanas y el pico sigue disminuyendo después de 4 semanas, demostrando que los tioles libres se reoxidan espontáneamente. Esto se corrobora mediante la observación de que el área superficial de pico total que desaparece en la posición de 19,5 minutos se recupera en las áreas superficiales de los picos que eluyen a 17,5 minutos y el postpico que se forma a 18,5 minutos, subrayando así que la masa total no cambiaba significativamente durante el almacenamiento (concretamente, no había pérdida de material, p.ej. debida a precipitación).

Durante este almacenamiento, se formó un pico a 18,5 minutos que aumenta con el tiempo de incubación. Este producto es probablemente la formación de piroglutamato en el extremo N que se observa típicamente para todos los nanocuerpos con un ácido glutámico N-terminal y almacenados a altas temperaturas.

Ejemplo 7: Análisis del nanocuerpo 13H5-9GS-13H5

Para confirmar que la variante relacionada con producto que aparece en la proteína RANKL008a expresada en *P. pastoris* corresponde a una variante en que se ha alterado el enlace disulfuro canónico, se analizó un constructo que contiene solo el bloque de construcción 13H5 de nanocuerpo anti-RANKL y que carece de la subunidad Alb8 de nanocuerpo anti-albúmina. Se ligaron dos bloques 13H5 por una secuencia ligadora de 9 GS y se denominó el constructo 13H5-9GS-13H5

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF
SSYPMGWFRQAPGKGREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA
AYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
SYPMGWFRQAPGKGREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
YIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 7).

Se expresó el constructo en *P. pastoris* y se purificó en condiciones idénticas a la aplicadas para RANKL008a.

Se analizó 13H5-9GS-13H5 por HPLC-FI y CL-EM del mismo modo que RANKL008a.

El análisis de 13H5-9GS-13H5 demuestra claramente que este constructo que carece del nanocuerpo antialbúmina muestra un resultado idéntico a RANKL008a tras análisis por HPLC-FI. El tiempo de elución para este constructo era, como se esperaba, anterior en el gradiente, y en este cromatograma se detectó no solo un claro postpico de aproximadamente un 25 %, sino que pudo identificarse un segundo postpico de aproximadamente un 6,3 %, sugiriendo que en esta preparación había también una población de moléculas carentes del enlace disulfuro en ambas subunidades de nanocuerpo. Análisis de CL-EM posteriores demostraron que el primer postpico tenía realmente una masa de + 2Da.

Se intercambió el tampón de dos alícuotas de 13h5-9GS-13h5 por Tris-HCl 20 mM, H 8,0, NaCl 100 mM. Después de este intercambio de tampón, se añadió $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a una de las muestras a una concentración final de 100 µM y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se retiró el exceso de Cu2+ mediante una etapa de intercambio de tampón adicional. Se determinó la concentración de proteína para ambas muestras:
13h5-9GS-13h5 no tratado: 1,50 mg/ml
13h5-9GS-13h5 tratado con Cu: 1,40 mg/ml

Se muestra en la Figura 12 el análisis de HPLC-FI en una columna C3 de HPLC-FI de 25 µg de cada muestra. Exponer la muestra a $CuSO_4$-$5H_2O$ 100 µM induce la formación de los puentes disulfuro en 13h5-9GS-13h5 como se evidencia por la desaparición de los postpicos en el cromatograma de HPLC-FI.

Ensayo de desplazamiento térmico

Se aplicó material de 13h5-9GS-13h5 no tratado y tratado con Cu2+ a un ensayo de desplazamiento térmico a una concentración final de 0,2 mg/ml con Sypro Orange en tampón D-PBS para determinar si pueden observarse diferencias en la estabilidad térmica de las moléculas.

La Figura 13 muestra las curvas de desplegamiento y las temperaturas de fusión respectivas:
→13h5-9GS-13h5 no tratado: Tm1 = 65,36 °C
Tm2 = 73,81 ºC
→13h5-9GS-13h5 tratado con Cu2+: Tm1 = 73,66 ºC

Estos perfiles muestran que, en la proteína correctamente plegada, se observa una única temperatura de fusión correspondiente al desplegamiento de la subunidad 13H5. En contraposición, la muestra no tratada muestra dos transiciones, una correspondiente a la de la subunidad 13H5 correctamente plegada mientras que la otra subunidad 13H5, que carece del enlace disulfuro, se despliega ya a menores temperaturas.

Ejemplo 8: A pesar de la presencia de la variante estructural, la función del material producido por *P. pastoris* estaba sorprendentemente intacta

Es conocido por la producción de, p.ej., fragmentos de anticuerpo Fab convencionales en *P. pastoris*, que la formación de enlaces disulfuro intercatenarios era el factor limitante de la velocidad para el ensamblaje y secreción de Fab funcionales (p.ej., Gasser *et al*. Biotechnol. Bioeng. 94: 353, 2006).

Por lo tanto, debería esperarse que la presencia de cantidades significativas de variante relacionada con producto en nanocuerpos producidos por *P. pastoris* comprometiera igualmente la función. Se esperaría que la presencia de un 10-25 % de variante relacionada con producto que carece de un enlace disulfuro diera como resultado la correspondiente pérdida de función.

Sin embargo, sorprendentemente, la comparación funcional del material producido por *E. coli* y *P. pastoris* no reveló ninguna diferencia en términos de la función de nanocuerpo. Más específicamente, los datos funcionales (Biacore y ELISA) descritos anteriormente eran iguales para los diferentes materiales.

Biacore

Como se esboza anteriormente, el análisis de Biacore de la unión de RANKL008a a HSA o RANKL era comparable para material derivado de *E. coli* y *P. pastoris*, y no está afectada por la presencia de un 10-15 % de variante relacionada con producto. Por ejemplo, como se estableció por HPLC-FI, el lote P#270308nr1 producido por *P. pastoris*, que se analizó por Biacore, contiene aproximadamente un 15 % de variante relacionada con producto. No obstante, los datos descritos anteriormente indican una funcionalidad no comprometida como refleja la unión inalterada a chips de HSA o RANKL mediante Biacore. Esto es notable a la vista del hecho de que el ensayo de Biacore tenía una sensibilidad que podía resolver claramente una diferencia de concentración del 10 % (véase anteriormente).

Por tanto, puede asumirse que el bloque de construcción 13H5 de nanocuerpo RANKL008a en que no se forma el puente disulfuro canónico sorprendentemente es totalmente funcional (véanse las tablas 2 y 3). Se hicieron observaciones similares cuando se ensayaron otros lotes de material en experimentos independientes (datos no mostrados).

ELISA

Para RANKL008a, se han efectuado tanto el ensayo de inhibición de RANKL como el ensayo de unión a HSA en un lote producido por *P. pastoris* que contiene aproximadamente un 15 % de la variante (P#080408nr2) y material derivado de *E. coli* que contiene solo el RANKL008a intacto. No había diferencia en este ensayo funcional (véanse las Tablas 4a y 4b).

Ejemplo 9: Evaluación de diferentes cepas de hospedador

Se transformó el gen de RANKL008a por electroporación en las cepas de *P. pastoris* X-33, KM71H y SMD 1168H (todas las cepas obtenidas de Invitrogen) mediante técnicas estándares. Se efectuó la expresión de las cepas KM71H y SMD 1168H en cultivos de 1 ml de medio BMCM e inducidos por la adición de metanol; se analizaron para dada cepa dos clones diferentes. Se sometieron las muestras de estas expresiones de matraz agitado a análisis de HPLC-FI. Para RANKL008a de X-33, se ensayaron repetidamente varios clones, p.ej. clon 5 y clon 17, y no se observó diferencia en la proporción de la variante entre los diferentes clones.

Para evitar tener que purificar el material del sobrenadante de cultivo clarificado mediante el proceso de purificación en tres etapas estándar, se usó una metodología para capturar RANKL008a del sobrenadante de cultivo mediante una sencilla depuración con proteína A: brevemente, se mezcla sobrenadante de cultivo en modo por lotes con una cantidad de resina de proteína A, se incuba y se eluye por lotes. La pureza del material es tal que es posible una aplicación directa (25 µg) a la columna de HPLC-FI. El procedimiento es semicuantitativo y da una indicación de los rendimientos de expresión e integridad de las diferentes muestras analizadas.

La Tabla 6 resume la integración de la superficie de área de pico de HPLC-FI del análisis de los diferentes sobrenadantes de cultivo a partir de las expresiones efectuadas en cepas KM71H y SMS 1168H en comparación con un material de referencia purificado obtenido a partir de la expresión de la cepa X-33.

Cepa usada para expresión	Referencia	% de área superficial de pico de HPLC-FI atribuido a la variante (postpico)
X-33	P#270308*	14,7
SMS 1168H	R8SM180408nr1	10,9
SMS 1168H	R8SM180408nr2	6,3
KM71H	R8SM180408nr1	12,7
KM71H	R8SM180408nr2	12,8

Tabla 6: Sumario de la determinación del % of PRV-RANKL008a (postpico) determinado por HPLC-FI en el sobrenadante de expresiones de RANKL008a en diferentes cepas de *Pichia*.

* material purificado: se analizaron todas las demás muestras después de una etapa de depuración con ProtA como se describe anteriormente.

Los datos de la Tabla 6 y el análisis de los diferentes clones de RANKL008a producido en X-33 (datos no mostrados) revelan que la proporción de PRV-RANKL008a no es significativamente diferente si se expresa en cepas diferentes o entre diferentes clones de una cepa.

Ejemplo 10: Efecto de las condiciones de fermentación sobre PRV-RANKL008a

Se ensayó a varias condiciones en fermentaciones por lotes y alimentadas por lotes la expresión de RANKL008a; típicamente se efectúan lotes alimentados por glicerol y se inicia la inducción mediante la adición de metanol. Se efectuaron todas las optimizaciones con el clon 5 de la cepa X33 de RANKL008a. El protocolo estándar era el protocolo de Invitrogen: expresión a 30 ºC en medio salino basal con un caudal de metanol de 10 ml/l·h.

La composición del medio salino basal adecuado, p.ej. para *Pichia pastoris*, era la siguiente:

Material bruto	**Concentración**
Ácido fosfórico, 85 %	26,7 ml/l
Sulfato de calcio	0,96 g/l
Sulfato de potasio	18,2 g/l
Sulfato de magnesio·7H_2O	14,9 g/l
Hidróxido de potasio	4,13 g/l
Glicerol	40 g/l
Agua OI	Ajustar a 995 ml
Sales traza PTM (Tabla 8) (añadidas después del autoclave)	4,35 ml (230 x solución madre)/l

Tabla 7: Medio basal de fermentación

Material bruto	**Concentración**
Agua OI	~700 ml
Ácido cúprico·$5H_2O$	6 g/l
Yoduro de sodio	0,08 g/l
Sulfato de manganeso·H_2O	3 g/l
Molibdato de sodio·$2H_2O$	0,2 g/l
Ácido bórico	0,02 g/l
Cloruro de cobalto	0,5 g/l
Cloruro de cinc	20 g/l
Sulfato ferroso·$7H_2O$	65 g/l
Biotina	0,2 g/l
Ácido sulfúrico	5 ml/l
Agua OI	Ajustar a 1 l

Tabla 8: Sales traza PTM (230x solución madre; esterilizada por filtración a 0,22 µm).

En algunos experimentos, se usó un medio rico para cultivar *P. pastoris:*

Componentes del medio	Concentración
Extracto de levadura	20 g/l
Dihidrogenofosfato de potasio	13,5 g/l
Sulfato de amonio	1,0 g/l
Sulfato de magnesio·$7H_2O$	15 g/l
Dicloruro de calcio·$2H_2O$	0,8 g/l
Glicerol	60,0 g/l
Agua OI	Ajustar a 990 ml

Tabla 9: Medio rico (componentes añadidos antes del autoclave)

Se añaden después del autoclave los siguientes componentes al medio rico (adiciones postesterilización):

Sales traza (tabla 11)	10 ml/l (100 x solución madre)
Biotina	2 ml/l de la solución madre 0,2 g/l

Tabla 10: Adiciones postesterilización después del autoclave

La solución madre de sales traza para el medio rico tiene la siguiente composición:

Material bruto	Conc. requerida (por l)
Agua OI	~700 ml
H_2SO_4 (conc.)	10,0 ml
$FeSO_4·7H_2O$	30,0 g
$ZnSO_4·7H_2O$	4,25 g
$CuSO_4·5H_2O$	1,90 g
$Na_2Mo_4·2H_2O$	2,00 g
H_3BO_3	0,50 g
Ácido cítrico (anhidro)	0,27 g
Agua OI	Hasta 1 litro

Tabla 11: Sales traza (100x solución madre; esterilizada por filtración a 0,22 µm).

La siguiente tabla resume las condiciones ensayadas para la optimización de fermentaciones alimentadas por lotes de RANKL008a:

Medio	Modificación del protocolo estándar	Título estimado (%) *	Degradación **	% de PRV-RANKL008a por HPLC-FI ***
Medio salino basal	-	100	+++	15
Medio salino basal	Alimentación baja en metanol a 5 ml/l·h	140	+++	1
Medio salino basal	Baja conductividad (25 mS/Cm frente a 40 mS/Cm)	<100	+++	1
Medio salino basal	Menor temperatura durante la inducción, 25 ºC frente a 30 ºC	<100	+++	1-4
Medio salino basal	+ extracto de levadura o peptona	200	(+)	3-8
Medio rico		400	(+)	18

Tabla 12: Sumario de las estrategias de fermentación para la expresión de RANKL008a en *Pichia pastoris* cepa X33

clon 5.

* % del control crecido en condiciones estándares (primera línea de la tabla anterior), determinado en sobrenadante libre de células por análisis de PAGE-SDS y tinción (azul brillante de Coomassie o tinción con Krypton) y comparación visual con un carril de referencia cargado con una cantidad fija de material, para algunas condiciones análisis densitométrico adicional en comparación con una curva de referencia obtenida con material purificado. Por lo tanto, estos números deberían considerarse semicuantitativos.
** determinado a partir del análisis de PAGE-SDS teñido con Coomassie y juzgado como +++ degradación pronunciada y (+) degradación fuertemente reducida en fragmentos de degradación divalentes y monovalentes
*** análisis de HPLC-FI de sobrenadante de cultivo depurado con ProtA. Se expresa el % de PRV-RANKL008a como el % de área de pico superficial total para ese proceso.

Se concluye a partir de la tabla lo siguiente:

Hay una correlación entre el título observado y el % de PRV-RANKL008a durante la expresión, concretamente cuanto mayor es el título mayor es el % de PRV-RANK008a en el material.

Las condiciones de menor temperatura, menor alimentación de metanol y/o conductividad reducida dan como resultado una menor velocidad de crecimiento y título, pero una población de proteína RANKL008a que está desprovista de la variante. Sin ligarse a teoría alguna, esto puede sugerir que el estrés metabólico en *P. pastoris* durante la expresión es el impulsor para la formación de variante que carece del enlace disulfuro.

La Figura 7 demuestra que realmente el material purificado a partir de una fermentación alimentada por lotes con la estrategia de baja alimentación de metanol o el material obtenido por expresión en *E. coli* muestra la ausencia de variante relacionada con producto (en este cromatograma, que eluye a 22,5 minutos).

Se efectuó el análisis de PAGE-SDS (datos no mostrados) de sobrenadante de cultivo clarificado (20 µl/carril) de RANKL008a expresado en condiciones de baja alimentación de metanol (4 ml/h·l) baja conductividad (20 mS/cm) a 25 ºC y en medio salino basal. Para cada condición, se analizaron diferentes puntos temporales después de la inducción (0, 9, 31 y 43 h). Se cargó una referencia de 300 ng para comparación. La banda principal a aproximadamente el marcador de 37 kDa corresponde a RANKL008a intacto. Las bandas pronunciadas a 22 y 14 kDa correspondían a los fragmentos de degradación de RANKL008a, fragmento divalente y fragmento monovalente, respectivamente. Se observó que la condición con baja alimentación de metanol tiene una mayor expresión que las otras dos condiciones ensayadas (conductividad y temperatura). En las tres condiciones, la degradación era pronunciada.

La adición de extracto de levadura y peptona durante la fermentación daba como resultado una degradación significativamente menor del material intacto y una formación algo menor del porcentaje de variante. Sin ligarse a teoría alguna, esto puede atribuirse probablemente al hecho de que la adición de sustrato extra desviará la actividad proteasa de RANKL008a al sustrato bruto presente en el extracto de levadura y peptona. El efecto de la adición de extracto de levadura y peptona sobre los patrones de degradación es tal que la degradación está virtualmente ausente. El proceso posterior de este material, que contiene muchos menos fragmentos de degradación, es mucho más directo y las recuperaciones de material intacto son mayores, y por lo tanto esta es una estrategia preferida.

Ejemplo 11: Sobreexpresión de proteína disulfuro isomerasa en *P. pastoris*

La enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI), una proteína de 55 kDa, ha mostrado ser un catalizador en el plegamiento de proteína, formación de enlace disulfuro e isomerización en el retículo endoplásmico (RE) de células eucarióticas (Freedman *et al.* Trends Biochem. Sci. 19: 331, 1994; Wilkinson *et al*. 2005, J. Biol. Chem. 280: 11483). La PDI está implicada en la formación de la estructura de inmunoglobulinas *in vivo*. (González *et al*. Biotecnnol. Prog. 17: 217, 2001; Nilsson *et al.* Immunol. Lett. 94: 83, 2004).

La coexpresión de anticuerpos con PDI se ha aplicado para aumentar las velocidades de secreción y/o niveles de producto funcional (Humphreys *et al.* FEBS Lett., 380: 194, 1996; Hsu *et al.* Protein Expr. Purif. 7: 281, 1996; Shusta *et al.* Nat. Biotechnol. 16: 773, 1998; Borth *et al.* Biotechnol. Prog. 21: 106, 2005). Durante la fermentación de una cepa de *Pichia pastoris* que expresa un Fab, por ejemplo, se observó la formación de enlaces disulfuro intercatenarios como factor limitante de la velocidad para el ensamblaje y secreción de Fab funcionales. La coexpresión de este Fab con PDI en *P. pastoris* aumentó el nivel de Fab secretado 1,9 veces (Gasser *et al.* Biotechnol. Bioeng. 94: 353, 2006). En estos procedimientos, se aplicó la coexpresión con PDI para obtener velocidades de expresión yo niveles de producto funcional aumentados.

En contraposición con las dificultades anteriores observadas con anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, los nanocuerpos pueden expresarse y secretarse en *P. pastoris* a suficiente velocidad y nivel así como funcionalidad (véase anteriormente), concluyendo que la coexpresión con PDI podría no ser un requisito. Sin embargo, en una fracción de los nanocuerpos obtenidos, se observó la presencia de tiol libre debido a residuos de cisteína desapareados. La ausencia de estos puentes disulfuro tendrá un efecto sobre la calidad y homogeneidad del

producto de nanocuerpo final y como tal es indeseable, en particular en vista del uso terapéutico de estos productos.

Clonación del gen de PDI y generación de cepas de *Pichia* que sobreexpresan PDI1

Se extrajo el gen que codifica PDI1 por PCR del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* usando el cebador FW 5'- Gaattcatgaagttttctgctggtgccg-3'(SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso 5'- ctcgagTTACAATTCATCGTGAATGGCATCTTCTTCG-3'(SEQ ID NO: 2) y se clonó en el vector pcr4-TOPO.

A través de digestión con EcoRI/XhoI, se clonó la región de codificación de PDI en un derivado pPic6 (Invitrogen) bajo el control del promotor GAP constitutivo usando técnicas de clonación estándares y se transformó en una cepa de *Pichia* que expresa RANKL008a.

Se recuperó la siguiente secuencia proteica (SEQ ID NO: 3):

MKFSAGAVLSWSSLLLASSVFAQQEAVAPEDSAVVKLATDSFNEYIQSHDLVLAEFFAPWCGHCKNMA
PEYVKAAETLVEKNITLAQIDCTENQDLCMEHNIPGFPSLKIFKNSDVNNSIDYEGPRTAEAIVQFMI
KQSQPAVAVVADLPAYLANETFVTPVIVQSGKIDADFNATFYSMANKHFNDYDFVSAENADDDFKLSI
YLPSAMDEPVVYNGKKADIADADVFEKWLQVEALPYFGEIDGSVFAQYVESGLPLGYLFYNDEEELEE
YKPLFTELAKKNRGLMNFVSIDARKFGRHAGNLNMKEQFPLFAIHDMTEDLKYGLPQLSEEAFDELSD
KIVLESKAIESLVKDFLKGDASPIVKSQEIFENQDSSVFQLVGKNHDEIVNDPKKDVLVLYYAPWCGH
CKRLAPTYQELADTYANATSDVLIAKLDHTENDVRGVVIEGYPTIVLYPGGKKSESVVYQGSRSLDSL
FDFIKENGHFDVDGKALYEEAQEKAAEEADADAELADEEDAIHDEL

Se efectuaron estudios de transformación y expresión de X-33 de *Pichia* de tipo silvestre y derivados mediante técnicas estándares y de acuerdo con el manual del usuario de pPicZa3phaA, B y C versión D, 110801, 25-0148 de Invitrogen. Se confirmó que los clones sobreexpresan PDI1 por transferencia Western.

Análisis de RANKL008a obtenido de cepas de *Pichia* que sobreexpresan PDI frente a cepa de control

A partir de los experimentos anteriores, resultaba evidente que el postpico corresponde a la variante de RANKL008a que carece de un puente disulfuro. Se determinó el porcentaje de este pico de variante cuando se expresaba RANKL008a en la cepa X-33 de *P. pastoris* silvestre o en una cepa modificada que sobreexpresa PDI1. Para cada cepa, se ensayaron 5 clones diferentes. La integración del área de postpico en el perfil de HPLC-FI mostró que había una reducción pequeña pero significativa del postpico cuando se expresaba RANKL008a en la cepa que sobreexpresa PDI1 (18,96 ± 0,98 % frente a 14,82 ± 0,91 %; el porcentaje hace referencia al % de área de pico total). Estos experimentos demuestran claramente el efecto de PDI1 sobre la formación de puentes disulfuro en la molécula de RANKL008a.

Ejemplo 12: Procedimientos cromatográficos ensayados para retirar PRV-RANKL008a

Es indeseable generar, p.ej., una sustancia farmacológica que contenga tanto una población de RANKL008a intacto como una proporción significativa de variante "inestable" (tras almacenamiento). Por lo tanto, se analizó en etapas cromatográficas "estándares" su capacidad de retirar esta variante particular.

En particular, se investigó en una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de intercambio catiónico en SP-Sepharose su capacidad de resolver el material intacto y la variante. Se analizaron los picos de lavado y elución más importantes de estas cromatografías por HPLC-FI para visualizar cualquier separación.

Se encontró que la variante relacionada con producto no podía separarse del pico principal por cromatografía de interacción hidrófoba ni cromatografía de intercambio catiónico en SP-Sepharose.

Hay también la posibilidad de retirar la variante usando una resina de afinidad de tiol-Sepharose como se describe anteriormente. Aquí se demuestra que la variante que carece de un enlace disulfuro y por tanto que contiene tioles libres puede retirarse realmente en esta resina, si la proteína se desnaturaliza totalmente, p.ej. en presencia de urea 6 M.

Ejemplo 13: Replegamiento en presencia de desnaturalizante y tampones rédox

Para investigar si el enlace disulfuro no formado en la subunidad 13H5 de RANKL008a puede hacerse formar, se ensayaron "tampones de replegamiento" aplicados comúnmente, que implican desnaturalización y replegamiento en presencia de un tampón rédox y posterior retirada del tampón de replegamiento por diálisis. Los datos obtenidos por

los experimentos de unión a tiol-Sepharose ilustran también que puede ser necesario cierto grado de desplegamiento durante este proceso.

La Tabla 13 resume los resultados experimentales más relevantes:

Condición ensayada	Efecto sobre PRV-RANKL008a a juzgar por la HPLC-FI
Clorhidrato de guanidinio 6 M (GdnHCl)	Completamente retirado
Tampón rédox solo (cistamina/cisteamina)	Parcialmente retirado
GdnHCl 2 M + posterior dilución en cistamina/cisteamina (1:5, mM:mM)	Completamente retirado
GdnHCl 2 M + posterior dilución en GSH/GSSG (5:1, mM:mM)	Parcialmente retirado
GdnHCl 2 M + posterior dilución en cistamina/cisteamina, condiciones de cinética de tampón y tampón rédox óptimo	Completamente retirado
Replegamiento del material del lote mayor en condición de GdnHCl 2 M + cistamina/cisteamina (5:1, mM:mM) a temperatura ambiente durante una noche + diálisis posterior y análisis del material replegado	Completamente retirado
Urea 3 M + tampón de cistamina/cisteamina 1:5 (mM:mM), incubación durante una noche a temperatura ambiente	Completamente retirado

Los datos de resumen anterior presentados en la tabla pueden describirse brevemente como sigue:

Se mezcló el análisis por HPLC-FI de un lote de RANKL008a (lote P#270308nr1) que contiene aproximadamente un 15 % de PRV con GdnHCl 6 M (en algunos casos, a lo largo de esta solicitud se abrevia el clorhidrato de guanidinio también como "GuHCl") y se sometió a diálisis frente a D-PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco). Se tomaron muestras después de diferentes puntos temporales entre 0,5 y 10 h de la diálisis. Se retiró la variante, que estaba presente en la preparación de RANKL008a a aproximadamente un 15 %, después de desnaturalización y posterior diálisis con D-PBS; sin embargo, apareció un nuevo hombro no identificado en el pico principal (datos no mostrados).

Se diluyó el mismo lote de RANKL008a (lote P#270308nr1) en tampón de cistamina/cisteamina hasta una concentración final de 1:5 mM:mM de cistamina/cisteamina sin desnaturalizante en el tampón (D-PBS). Se tomaron muestras después de una incubación de entre 20 minutos y una noche a temperatura ambiente y se inyectaron directamente en la columna de HPLC-FI. Puede concluirse que la presencia del par rédox cistamina/cisteamina en el tampón convierte parcialmente la variante; después de una incubación adicional de una noche, se observó cierta reducción adicional de la proporción de variante (datos no mostrados).

Se mezcló el mismo lote de RANKL008a (lote P#270308nr1) con GdnHCl 2 M durante 30 minutos a TA y se diluyó posteriormente en tampón rédox de cistamina/cisteamina 1:5 (mM:mM) hasta una concentración final de GdnHCl 1,0 M, 0,5 M, 0,25 M y 0,125 M y una posterior incubación durante una noche a 4 ºC. Se aplicaron directamente las muestras a una columna de HPLC-FI. Se registran los trazos 214 nm y se muestran en la Fig. 8. La Figura 8 ilustra que si se mezcla RANKL008a por adelantado con GdnHCl 2 M ("GuHCl" en la figura), la proteína sigue conteniendo la variante con las cisteínas desapareadas; sin embargo, tras dilución del tampón rédox e independientemente de la concentración final de GdnHCl en el tampón, se retira completamente la variante como se evidencia por HPLC-FI.

Pudieron observarse reducciones de la variante a diferentes concentraciones de GdnHCl y diferentes relaciones de cistamina/cisteamina, p.ej. en el intervalo de 5:1 a 1:5. El replegamiento es más eficaz en presencia de GdnHCl 2 M que 1 M, y de cistamina 5 mM/cisteamina 1 mM en comparación con la relación inversa (Fig. 9). El replegamiento es casi completo después de 3 h y completo después de 6 h a temperatura ambiente (Fig. 10).

Se sometió la muestra de la Fig. 9 (línea continua, GdnHCl 2 M, cistamina/cisteamina 5:1 mM) a diálisis para retirar el tampón rédox e investigar si el material contiene ahora solo la forma completamente oxidada de RANKL008a. Por lo tanto, se analizó el material dializado por HPLC-FI y CL-EM. Se confirmó por HPLD-FI antes y después de la diálisis y/o tratamiento con SEC que el material permanece totalmente oxidado también en ausencia del tampón rédox. Se analizaron también las muestras por CL-EM para verificar la masa correcta después del tratamiento.

Se mezcló el mismo lote de RANKL008a (lote P#270308nr1) con GdnHCl 2 M durante 30 minutos a TA y se diluyó posteriormente en tampón rédox GSH/GSSH (glutation/glutation reducido) 5:1 (mM:mM) hasta una concentración final de GdnHCl entre 1,0 M y 0,125 M (en D-PBS) y posterior incubación durante una noche a 4 ºC. Se aplicaron directamente las muestras a una columna de HPLC-FI. Mezclando RANKL008a por adelantado con GdnHCl 2 M (asumiendo un desplegamiento parcial de la proteína), la proteína sigue conteniendo la variante con las cisteínas desapareadas; tras dilución del tampón rédox con glutation/glutation reducido e independientemente de la concentración final de GdnHCl en el tampón, la variante no se retiraba en estas condiciones particulares (datos no mostrados).

En un experimento separado, se encontró que una condición de urea 3 M y tampón de cistamina/cisteamina 1:5 mM puede conducir al replegamiento de la variante de RANKL008a.

En conclusión, puede conseguirse un replegamiento óptimo en condiciones que conducen a la desnaturalización parcial de RANKL008a, p.ej. GdnHCl 2 M o urea 3 M. Puede conseguirse la formación completa del enlace disulfuro faltante, y se confirmó por análisis de CL-EM de la muestra dializada frente a D-PBS.

El análisis por cromatografía de exclusión por tamaño reveló que, durante la diálisis posterior al replegamiento de RANKL008a en presencia de GdnHCl y tampón rédox, está presente una proporción de RANKL008a como agregado dimérico de RANKL008a. Este dímero está ausente del material antes de la diálisis e indica claramente que, mientras que los componentes rédox se dializan fuera de la mezcla, una proporción de RANKL008a forma un retículo intermolecular en las cisteínas libres que se vuelven temporalmente accesibles, permitiéndoles “escapar” a la oxidación intramolecular (confirmado por análisis PAGE-SDS (reductor y no reductor), datos no mostrados).

Ejemplo 14: Efecto de la temperatura y la oxigenación sobre la proporción de PRV-RANKL008a

Se muestra aquí que elevar la temperatura y/u oxigenación de la muestra conduce a la formación del puente disulfuro faltante en uno o ambos de los dominios de unión a RANKL.

Se oxigenó RANK008a purificado en solución a temperatura elevada. Se efectuó esto en un recipiente de fermentación en que la temperatura puede controlarse a 50 ºC y se purgó la muestra con O_2 con agitación suave (apareció espumación). Se tomaron muestras a intervalos regulares y se midió el porcentaje de PRV-RANKL008a visible en el análisis de HPLC-FI como postpico medido aproximadamente a los 2 min desde el pico principal. Pudo mostrarse que este tratamiento da como resultado la conversión de la variante en material intacto. Al mantener la muestra a 50 ºC durante aproximadamente 3 horas, se observó cierta disminución, la adición de O_2 aceleró claramente la disminución de la variante, indicando que las condiciones de mayor temperatura están acompañadas por la formación del enlace disulfuro en la variante. Después de aproximadamente 450 minutos a 50 ºC y oxigenación, disminuyó el porcentaje de variante en la muestra un 50 %. Se observó el efecto para el postpico que eluye a +2 min desde el pico principal y que corresponde a la variante de RANKL008a en que falta un enlace disulfuro único; además, el postpico 2, que se asume que representa la variante en que falta el enlace disulfuro en cada una de las subunidades 13H5 y que eluye a +4 min desde el pico principal, era también sensible al tratamiento descrito anteriormente.

Ejemplo 15: Efecto de pH, temperatura y adición de agentes oxidantes sobre la retirada de PRV-RANKL008a

Se efectuaron una serie de experimentos en que se ensayaron los efectos de pH, temperatura (o combinaciones de ambos) y adición de agentes oxidantes, p.ej., Cu2+ ejemplificado por $CuSO_4$.

Inicialmente, se ensayaron estas condiciones en un lote purificado de RANKL008a que contenía más de un 10 % de la variante y que estaba a una concentración de 7,8 mg/ml en PBS. En algunas de estas condiciones, especialmente la adición de $CuSO_4$, se observó la formación de un precipitado visible en las mezclas. Esto se atribuyó al hecho de que el Cu2+ en estas condiciones forma $Cu_3(PO_4)_2$ insoluble. Por lo tanto, se ensayaron condiciones en que la muestra se dializaba con una solución de $CuSO_4$ en lugar de por adiciones directas. Como alternativa, pueden aplicarse fácilmente diferentes sistemas de tampón para evitar la formación del precipitado. Por ejemplo, en los experimentos de seguimiento, se intercambió el tampón de las muestras por tampón Tris-HCl-HCl.

En la siguiente tabla, se resumen las diferentes condiciones que se ensayaron. Se usó RANKL008a lote P#080408nr2 a 7,8 mg/ml en D-PBS.

Condiciones	Acción	Incubaciones			Conc. mg/ml	Apariencia visual
pH 8,0	Diluir en Tris-HCl-HCl pH 8,0	Una noche a TA	2 h a 37 ºC	2 h a 55 ºC	1	Transparente
pH 9,0	Diluir en Tris-HCl-HCl pH 8,0	Una noche a TA	2 h a 37 ºC	2 h a 55 ºC	1	La muestra calentada a 55 ºC contiene precipitado tras enfriar a TA
$CuSO_4$ 1 mM	Dializar con $CuSO_4$ 1 mM durante 2 h a 4 ºC y dializar entonces durante una noche con PBS	2 h a 4 ºC			1	Transparente. La concentración de proteína después de la diálisis es de 0,94 mg/ml (sin pérdida de material)
$CuSO_4$ 0,5 mM + inactivación por adición de EDTA	Diluir en $CuSO_4$ 1 mM + EDTA 1 mM + ácido cítrico 20 mM pH 7,0*	Una noche a 4 ºC			4	

Tabla 14: Esquema de tratamiento de muestra ensayado para la reducción de PRV-RANKL008a en condiciones de pH y temperatura aumentados y adición de Cu2+.

Se sometieron las muestras a análisis de HPLC-FI y se determinaron las áreas de la superficie de pico. Se expresan los resultados en UMA/pico para el pico principal, eluyendo el pico a 0,2 minutos (correspondiente a la variante de piroglutamato) y el postpico a +2 minutos correspondiente a la variante que carece del enlace disulfuro.

pH 8	No tratado	TA	37 ºC	55 ºC
Principal	1268	1280	1299	1301
Principal + 0,2 min	41	43	45	42
Principal + 2 min	220	220	224	11
Suma de todos los picos	1529	1543	1568	1354
pH 9	No tratado	TA	37 ºC	55 ºC
Principal	1268	1260	1280	1249
Principal + 0,2 min	41	40	42	47
Principal + 2 min	220	156	160	0
Suma de todos los picos	1529	1456	1482	1296
Cu2+	No tratado	$CuSO_4$ 1 mM	$CuSO_4$ 1 mM + inactivación	
Principal	1268	1530	1255	
Principal + 0,2 min	41	55	40	
Principal + 2 min	220	0	204	
Suma de todos los picos	1529	1585	1499	

Tabla 15: Área superficial de pico para los picos individuales: área superficial de pico (UMA) de los diferentes picos observados en el cromatograma de HPLC-FI de muestras de RANKL008a incubadas a diferentes temperaturas a pH 8,0, a pH 9 o en condiciones en presencia de $CuSO_4$ con o sin inactivador en comparación con muestra no tratada en condiciones como se especifican en la tabla anterior.

A partir de los datos resumidos en la Tabla 15, resulta evidente que:

Mantener la muestra a una temperatura de 55 ºC promueve la formación del enlace disulfuro en la variante.

Mantener la muestra a una temperatura de 55 ºC y pH 9 conduce a cierta pérdida de material como se evidencia por la formación de un precipitado, la menor área superficial total recuperada en la HPLC-FI ilustra que se pierde algo de muestra durante el calentamiento (se observó un precipitado visible).

La formación del enlace disulfuro e la variante es más rápida a pH 9 que a pH 8 en condiciones comparables.

La incubación a pH 9 parece aumentar ligeramente la formación de la variante de piroglutamato.

Después de la exposición a $CuSO_4$ 1 mM, la variante no puede detectarse después de 2 horas de incubación. Una vez se retira el $CuSO_4$ por diálisis posterior, el enlace disulfuro permanece intacto. El área superficial total de la muestra antes y después del tratamiento con Cu2+ es comparable. Esto significa que toda la variante relacionada con producto se convierte cuantitativamente en el pico principal, concretamente el material intacto. Obsérvese que en estas condiciones la muestra está a pH 7.

El efecto oxidativo del Cu2+ se inactiva completamente por EDTA.

Se verificaron las muestras por CL-EM y se confirmó que en la muestra antes del tratamiento la variante a +2 minutos corresponde a una masa de +2 Da, mientras que esta masa de +2 Da no se observa en la muestra después de incubación durante una noche a pH 9 y después del tratamiento con $CuSO_4$.

Al final del experimento, se almacenaron las muestras durante 1 semana a 37 ºC y se reanalizaron por HPLC-FI. Los datos, expresados como % del área superficial total, se resumen en la siguiente tabla.

Muestra, ID	Pico	% de área	% de área después de 1 semana a 37 ºC
pH 8, TA	Pico principal	81,8	85,9
	+ 0,2 min	2,7	4,6
	+ 2 min	14,1	9,5
pH 8, 37 ºC	Pico principal	81,5	85,9
	+ 0,2 min	2,8	4,7
	+ 2 min	14,1	9,4
pH 8, 55 ºC	Pico principal	94	95,4
	+ 0,2 min	3	4,6
	+ 2 min	/	/
pH 9, TA	Pico principal	84,5	90,2
	+ 0,2 min	2,7	4,9
	+ 2 min	10,5	4,9
pH 9, 37 ºC	Pico principal	84,1	89,2
	+ 0,2 min	2,8	5,2
	+ 2 min	10,5	5,5
pH 9, 55 ºC	Pico principal	96,5	94,2
	+ 0,2 min	3,5	5,8
	+ 2 min	/	/
Diálisis con $CuSO_4$ 1 mM	Pico principal	96,5	95,0
	+ 0,2 min	3,5	5,0
	+ 2 min	/	/
$CuSO_4$ 1 mM, EDTA 1 mM, ácido cítrico 20 mM pH 7,0	Pico principal	83,7	86,5
	+ 0,2 min	2,6	3,3
	+ 2 min	13,6	10,3

Tabla 16: Análisis de HPLC-FI, % del área superficial de pico total, de muestras de RANKL008a incubadas a un mayor pH y temperatura o en presencia de $CuSO_4$ y sometidas a un almacenamiento adicional durante 1 semana a 37 ºC.

Las conclusiones de esta tabla son:

El % de área de pico atribuido a la variante de disulfuro presente en la muestra después del tratamiento de una noche inicial (p.ej., pH 8,0 37 ºC) se reduce adicionalmente tras un almacenamiento adicional de una semana a 37º C.

Tras almacenamiento a mayor pH (pH 8 y 9), en comparación con D-PBS para las muestras tratadas con $CuSO_4$, aumenta el % de variante de piroglutamato a +0,2 min.

El material sometido a tratamiento con Cu2+ y posterior diálisis permanece intacto después de 1 semana a 37 ºC, sugiriendo que el enlace disulfuro reoxidado es estable tras el almacenamiento.

En la muestra que contiene Cu2+ y el inactivador EDTA, la variante de disulfuro se reduce ligeramente, ilustrando que la inactivación es incompleta tras el almacenamiento.

En conclusión, en esta comparación se obtuvo la retirada más eficaz de la variante de disulfuro tratando la muestra con Cu2+; la reacción es rápida y la variante se convierte cuantitativamente en material intacto por el tratamiento; además, se prefiere que pueda efectuarse a pH neutro. No se requiere la presencia de desnaturalizante.

Las condiciones observadas durante el experimento anterior sugieren que la oxidación y formación del enlace disulfuro aparecen fácilmente mediante incubación de la muestra en presencia de Cu2+. En estos experimentos de seguimiento, se incluyeron diferentes lotes de material como se enumeran en la Tabla 17. Se incluyó un lote de 13H5-9GS-13H5 en estos experimentos. Se dializaron las muestras con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8) y se añadieron a partir de una solución madre de $CuSO_4$ concentraciones finales de 10 µM, 100 µM, 1 mM y 100 mM, se incubaron las muestras durante 2 h a temperatura ambiente y se dializaron entonces frente a D-PBS (durante una noche). Se añadió $CuSO_4$ en exceso 100 mM para detectar cualquier efecto de oxidación indeseable sobre el material.

ID de proteína	Lote	Observaciones
13H5-9GS-13H5	B7#310708	Nanocuerpo divalente producido en *P. pastoris*, ± 24 % de postpico que carece de un puente disulfuro, ± 6 % de postpico que carece de dos puentes disulfuro
RANKL008a	P#080408nr2	Producido en *P. pastoris*, ± 15 % de postpico que carece de un puente disulfuro
RANKL008a	P#110708	Producido en *P. pastoris*, ± 1 % de postpico que carece de un puente disulfuro
RANKL008a	B11#140208	Producido en *E. coli*, sin postpico

Tabla 17: Muestras expuestas a Cu2+ en Tris-HCl-HCl

Se analizaron las muestras en HPLC-FI y se graficaron los datos.

Los datos demuestran que en el nanocuerpo 13H5-9GS-13H5 divalente la variante que carece respectivamente de uno o dos enlaces disulfuro estaba casi un 100 % ausente después del tratamiento con $CuSO_4$ 1 mM, mientras que el proceso parecía ocurrir a menores concentraciones de $CuSO_4$ para el material RANKL008a expresado en *P. pastoris* que contiene aproximadamente un 15 % de variante (véase la Fig. 11). En ninguno de los cromatogramas y materiales (expresados en *E. coli* o en *P. pastoris* o con diferentes porcentajes de variante), se observó la formación de prepicos significativos (indeseables). Si se somete una muestra de RANKL008a a condiciones fuertemente oxidantes (en presencia de un desnaturalizante) tal como tratamiento con H_2O_2, se observó la formación de productos de oxidación de metionina que eluyen típicamente antes del pico principal. En ninguno de los cromatogramas se observaron evidencias de la formación de prepicos significativos, indicando que el tratamiento con cobre no parece oxidar las metioninas en la proteína, ni el análisis de masa total detecta ningún aumento de masa de +16 Da que sería consistente con una oxidación única, por ejemplo en una metionina.

Ejemplo 16: Otros metales ensayados y otros agentes oxidantes

Se ensayaron Fe2+, Fe3+ y Zn2+, añadidos en forma de $FeSO_4$ y $ZnSO_4$, y se mostró que inducen también la formación del enlace disulfuro canónico en la variante (datos no mostrados). Se ha reseñado la autoxidación de tioles por iones de cobre en la bibliografía (Goldstein *et al*. Free Radical Biol. Med. 1986, 2, 3-11), mientras que se ha demostrado también que la formación de disulfuro intramolecular en péptidos sintéticos puede catalizarse por metales traza en los tampones (Cline *et al*. Analytical Biochemistry, 2004, 335, 168-170).

Se sugiere con esto que otros agentes oxidantes (yodo, DMSO, H_2O_2, glutation y otros) pueden acelerar la oxidación inducida por metal traza. Pueden ser también eficaces otras sales metálicas en la autoxidación de tioles libres.

Ejemplo 17: Práctica de la etapa de oxidación en producto purificado, caldo de cultivo y sobrenadante de cultivo clarificado

Se efectuaron todos los experimentos descritos anteriormente con RANKL008a purificado. Sin embargo, si se efectúa dicho tratamiento en las etapas finales de un proceso de producción, puede preverse tener cantidades traza de, p.ej., iones de cobre en el producto final, que tras almacenamiento pueden causar oxidaciones indeseadas adicionales de otros residuos aminoacídicos. Por lo tanto, se investigó si podía aplicarse dicho tratamiento a materiales anteriormente en el proceso de producción. Se efectuaron varios experimentos en muestras semipurificadas (después de una purificación de una etapa en SP-Sepharose que daba como resultado una pureza > 95 %) o en material que está presente en el caldo de cultivo no clarificado y/o medio de cultivo clarificado. Los datos confirman que, también en mezclas de proteínas menos puras, puede retirarse la variante tratando las muestras con $CuSO_4$ 1 mM a temperatura ambiente durante al menos 2 h.

En una realización preferible particular de la invención, se añade $CuSO_4$ 1 mM durante al menos 2 horas a temperatura ambiente en el sobrenadante de cultivo clarificado (llevado a pH 4,0) obtenido después de la fermentación.

Ejemplo 18: El análisis por HPLC-FI reveló la presencia de variante relacionada con producto similar en material producido por *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en el Ejemplo 3

Se produjo también RANKL008a en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se expresó RANKL008a en *Saccharomyces cerevisiae* (INVsc1) bajo el control del vector de expresión episómica pYES (Invitrogen). La proteína RANKL008a producida por *Saccharomyces cerevisiae* se purificó del sobrenadante clarificado con una resina de proteína A, se analizó por HPLC-FI (Figura 14) y se comparó con RANKL008 expresado en *Pichia pastoris*.

Como se determina a partir de la Figura 14, la proporción de variante con el enlace disulfuro faltante (postpico presente a aproximadamente +2 minutos desde el pico principal) era de 16,7 % para el material expresado en *S. cerevisiae* en comparación con 17,3 % cuando se secretaba por *Pichia pastoris*.

Se analizó el material purificado de sobrenadantes de *S. cerevisiae* en la Figura 14 y se sometió a análisis de CL-EM en un espectrómetro de masas por electropulverización Waters Q-Tof Ultima acoplado directamente con un

Bioseparations Module (HPLC, Waters) en el que se efectuó un análisis de HPLC-FI. Se deconvolucionaron los espectros de masa total usando el software MaxEnt (Waters) y demuestran que el postpico tenía una masa que era aproximadamente 2 Da mayor que el pico principal.

En los siguientes Ejemplos, se demostró que, tras la expresión de otros nanocuerpos en hospedadores no *E. coli*, se observaba también una variante relacionada con producto de estos nanocuerpos que carece de uno o más puentes disulfuro.

Ejemplo 19: Observaciones de una variante similar en el nanocuerpo A-1 expresado en *Pichia pastoris*

Se expresó en *P. pastoris* también otro constructo de nanocuerpo, el nanocuerpo A-1. El nanocuerpo A-1 consiste en dos dominios variables únicos idénticos condensados con un ligador de 3 alaninas y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 4) :

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPESVEGRF
TISRDNAKRTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEQGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLV
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPESVEGRFTISRD
NAKRTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEQGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Para el nanocuerpo A-1, se identificaron variantes similares que carecen del enlace disulfuro tanto por HPLC-FI como por análisis de CL-EM asociado de los diferentes picos de HPLC-FI. El tratamiento de estos nanocuerpos con $CuSO_4$ 1 mM durante 2 h a temperatura ambiente retiró la variante.

Ejemplo 20: Observaciones de una variante similar en nanocuerpo A-2 expresado en *Pichia pastoris*

Se produjo también el nanocuerpo A-2 en *P. pastoris*. El nanocuerpo A-2 es un nanocuerpo biespecífico que consiste en dos dominios variables únicos diferentes que tienen la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 5):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFT
ISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN
AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

Para el nanocuerpo A2, se identificaron variantes similares que carecen del enlace disulfuro tanto por HPLC-FI como por análisis de CL-EM asociado de los diferentes picos de HPLC-FI. El tratamiento de estos nanocuerpos con $CuSO_4$ 1 mM durante 2 h a temperatura ambiente retiró la variante.

Para el nanocuerpo A-2, se han observado dos postpicos distintos en el cromatograma de HPLC-FI (Figura 15). El postpico a Rt +2,6 min respecto al pico principal corresponde a una variante con una masa de +2 Da en comparación con la masa teórica, representando por tanto la variante con un puente disulfuro faltante. El postpico a Rt +3,5 min respecto al pico principal corresponde lo más probablemente a una variante que carece de dos puentes disulfuro, aunque esto no se ha confirmado todavía por CL-EM La observación de que este pico desaparecía después del tratamiento con $CuSO_4$ apoya sin embargo esta hipótesis (Figura 15).

Ejemplo 21: Observaciones de una variante similar en el nanocuerpo A-3 expresado en *Pichia pastoris*

Se expresó el nanocuerpo trivalente A-3

(DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWFRQAPG
KEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYD
WSYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNYVLGWF
RQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGTPLNPG
AYIYDWSYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGSLSNY
VLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLRPEDTAVYYCGAGT
PLNPGAYIYDWSYDYWGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 8)

en *Pichia pastoris* usando las condiciones estándares. Se analizó un análisis de HPLC-FI de una muestra de sobrenadante de cultivo (después de una etapa de depuración) en una columna de HPLC-FI C3 (condiciones a continuación) y se midió en cada pico la masa total por IEP-Q-TOF-EM. En la Figura 16, pueden identificarse cuatro picos, el primer pico corresponde a la masa esperada del nanocuerpo trivalente, mientras que cada postpico que

sigue difiere en 2 Da del pico anterior, representando por tanto una población de nanocuerpos con uno, dos o tres subdominios en que no se ha formado el enlace disulfuro.

Columna: ZORBAX 300SB-C3
Temperatura de columna: 80 ± 1 ºC
Fase móvil A: 0,05 % de TFA en 99,95 % de MilliQ
Fase móvil B: 0,05 % de TFA en 99,95 % de 1-propanol

A menos que se indique otra cosa, todos los procedimientos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describan específicamente con detalle pueden efectuarse y se han efectuado de manera en sí conocida, como resultará evidente para el especialista. Se hace referencia de nuevo por ejemplo a los manuales estándares y a la técnica antecedente general mencionada en la presente memoria y a las referencias adicionales citadas en los mismos, así como por ejemplo a las siguientes revisiones: Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving *et al.*, J. Immunol. Methods, 2001, 248 (1-2), 31-45; Schmitz *et al.*, Placenta, 2000, 21 supl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para ingeniería de proteínas tales como maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

Ejemplo 22: Observaciones de una variante similar en los nanocuerpos B-1, B- 2, B-3 y B-4 expresados en *Pichia pastoris*

Se produjeron también los nanocuerpos B-1, B-2, B-3 y B-4 en *P. pastoris* cepa X-33. Los nanocuerpos B-1, B-2, B-3 y B-4 son nanocuerpos trivalentes que consisten en tres dominios variables únicos diferentes que tienen las siguientes secuencias:

Nanocuerpo B-1 (SEQ ID NO: 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRF
TISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA
DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTY
YADSVKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSS

Nanocuerpo B-2 (SEQ ID NO: 10)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTYY
ADSVKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV
QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI
SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSS

Nanocuerpo B-3 (SEQ ID NO: 11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTYY
ADSVKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV
QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI
SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ
MNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSS

Nanocuerpo B-4 (SEQ ID NO: 12)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRF
TISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA
DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATIESGSRTY
YADSVKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSS

Se analizaron las muestras de fermentación por análisis de HPLC-FI, después de una depuración de muestra para comprobar las variantes relacionadas con producto. Se muestran los cromatogramas en las Figuras 17 (A-D). En cada uno de los constructos, estaban presentes altas cantidades de variante con un enlace disulfuro faltante: entre 30 y 55 % de la carga total estimada a partir del área superficial de la CFI. Se confirmó la identidad de este pico que eluye aproximadamente 2 min después de la molécula plegada correctamente (tR de aproximadamente 17 min en la HPLC-FI) por el hecho de que la formación del puente disulfuro podía inducirse por la adición de una baja concentración de Cu2+ al sobrenadante de cultivo. Los cromatogramas antes y después del tratamiento con Cu2+ muestran la desaparición del postpico significativo en el pico principal (comparar la línea continua con la línea de puntos).

Otros picos en el cromatograma podrían corresponder a otras variantes relacionadas con producto tales como la formación de piroglutamato en el extremo N o impurezas menores no retiradas por la depuración parcial de la muestra.

Ejemplo 23: Observaciones de una variante similar en el nanocuerpo B-5 expresado en *Pichia pastoris*

Se produjo también el nanocuerpo B-5 en *P. pastoris* cepa X-33. El nanocuerpo B-5 es un nanocuerpo que consiste en tres dominios variables únicos diferentes y tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 13):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRELVATINSGSRTYY
ADSVKGRFTISRDNSKKTLYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV
QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI
SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSS

Se purificó y analizó el nanocuerpo B-5 por HPLC-FI. La Figura 18 muestra un cromatograma superpuesto del material almacenado a -70 ºC (línea de puntos) en comparación con el mismo material después de 3 semanas de almacenamiento a 37 ° C (línea continua). El postpico que eluye aproximadamente a 20 min en el cromatograma consistía en material con un enlace disulfuro faltante, como se identifica por análisis de masas (+ 2 Da) en una CL-Q-TOF. Después de 3 semanas de almacenamiento a 37º C, este pico se redujo de 3,1 % (a t= 0, o almacenamiento a -70 ºC) a solo 0,2 %, debido a la oxidación espontánea del puente disulfuro correcto.

Sumario de los experimentos

A partir de todos los experimentos tomados en conjunto, puede derivarse la siguiente enseñanza general: tras la expresión en hospedadores no *E. coli,* tales como *P. pastoris* o *S. cerevisiae*, se observa una subpoblación de diferentes nanocuerpos, p.ej., RANKL008a, nanocuerpo A-1, nanocuerpo A-2, nanocuerpo A-3 y nanocuerpos B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5. Esta subpoblación representa una variante que carece del puente disulfuro canónico en al menos uno de sus subdominios (en caso de un constructo multimérico), o en el dominio de unión a antígeno único (en caso de un anticuerpo de dominio único). En el caso de RANKL008a, se encontró que faltaba un puente disulfuro en uno o dos de sus subdominios anti-RANKL. Se hicieron observaciones similares para otros nanocuerpos expresados también en *P. pastoris*. Si se expresa RANKL008a en *E. coli*, esta variante no se observa nunca.

El análisis de HPLC-FI detecta la variante que carece de disulfuro como un postpico en el cromatograma que eluye a aproximadamente +2 minutos desde el pico principal. El análisis de CL-EM demuestra que este pico contiene una masa compatible con la masa teórica esperada de +2 Da, concordante con la adición de dos hidrógenos. La medida directa de los tioles libres en RANKL008a, que tras el plegamiento apropiado no contiene tioles libres, muestra que pueden medirse tioles libres en la muestra y en una cantidad que puede correlacionarse con el % de variante como se estima a partir de la HPLC-FI. La variante se retira por unión por afinidad con una columna de tiol-Sepharose en condiciones desnaturalizantes.

Se han observado variantes relacionadas con producto similares para los nanocuerpos A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3,

B-4 y B-5.

Sorprendentemente, el rendimiento y potencia, tanto de la inhibición y unión de RANKL como de la unión de HSA, no están afectados por la variante de disulfuro, sugiriendo que la integridad estructural del nanocuerpo no se afecta por el enlace disulfuro faltante.

Las estrategias de replegamiento clásicas en condiciones desnaturalizantes en presencia de un par rédox pueden retirar la variante; sin embargo, durante este proceso una pequeña proporción de RANKL008a no forma un enlace disulfuro intramolecular, sino en lugar de ello un enlace disulfuro intermolecular y por tanto la formación de un dímero. Dicho dímero y productos secundarios oligoméricos potencialmente de mayor orden son indeseables en cualquier producto farmacéutico y harán el proceso de purificación más complejo.

Los tioles libres pueden llevarse también a formar el puente disulfuro deseado mediante el oxígeno presente en la solución, y esto se potencia por oxigenación, aumento del pH, aumento de la temperatura y/o alta presión. Sin embargo, la formación del enlace disulfuro en algunas de estas condiciones es bastante lenta y puede estar acompañada también de pérdida de proteína. Además, el pH y temperatura mayores pueden inducir potencialmente la formación de otras variantes (se potencia la formación de piroglutamato en el extremo N).

La adición de iones metálicos oxidantes, ejemplificados por Cu2+, Fe2+ y Zn2+, causaba la formación del puente disulfuro deseado. En particular, el Cu2+ daba como resultado una formación muy eficaz del enlace disulfuro en la variante a concentraciones relativamente bajas de este catalizador y se probaba aplicable tanto a materiales purificados como a muestras más brutas (caldo de cultivo o producto purificado toscamente). El uso de Cu2+ se ha reseñado anteriormente para la expresión recombinante de IL-2 y β-IFN (documento US 4.572.798). Después de retirar el Cu2+ de la mezcla, el enlace disulfuro permanece intacto. Además, este procedimiento no afecta a la potencia ni induce subproductos o variantes indeseados como se evidencia tanto por análisis de CL-EM como análisis de HPLC-FI.

Por ello, la adición de iones metálicos oxidantes representa una realización preferida de la presente invención.

Abreviaturas

13H5	bloque de construcción monovalente humanizado de RANKL008a de unión a RANKL
9GS	ligador de 9 aa de glicina y serina que une los bloques de construcción del nanocuerpo
ALB8	bloque de construcción monovalente humanizado de RANKL008a de unión a HSA
ACN	acetonitrilo
ºC	grados centígrados
D-PBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
ELISA	ensayo de inmunosorción ligado a enzima
F/T	congelar/descongelar
GdnHCl	clorhidrato de guanidinio
GuHCl	clorhidrato de guanidinio (GdnHCl)
HSA	seroalbúmina humana
HPLC	cromatografía líquida a alta presión
IEX-HPLC	HPLC con intercambio iónico (en este caso intercambio catiónico)
PBS	solución salina tamponada con fosfato
UMA	unidades de miliabsorción
CL-EM	cromatografía líquida acoplada con espectrómetro de masas
Min	minuto(s)
PM	peso molecular
EM	espectrometría de masas
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDI	proteína disulfuro isomerasa
PRV o PRV-SS	variante relacionada con producto de nanocuerpo que carece de un enlace disulfuro
RANKL	ligando del activador receptor del factor nuclear κB (RANK)
(C)FI	fase inversa (cromatografía)
HPLC-FI	HPLC en fase inversa
TA	temperatura ambiente
s	segundos
SE(C)-HPLC	exclusión por tamaño (cromatografía)-HPLC
CIT	corriente iónica total
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	tiempo de vuelo
w	semanas

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ablynx N.V.
<120> Procedimiento para la producción de anticuerpos de dominio
<130> P09-002-PCT-1
<150> US 61/174.184
<151> 30-04-2009
<150> US 61/304.834
<151> 16-02-2010
<160> 13
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 1
gaattcatga agttttctgc tggtgccg 28

<210> 2
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 2
ctcgagttac aattcatcgt gaatggcatc ttcttcg 37

<210> 3
<211> 522
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 3

```
Met Lys Phe Ser Ala Gly Ala Val Leu Ser Trp Ser Ser Leu Leu Leu
1               5                  10                  15

Ala Ser Ser Val Phe Ala Gln Gln Glu Ala Val Ala Pro Glu Asp Ser
            20                  25                  30

Ala Val Val Lys Leu Ala Thr Asp Ser Phe Asn Glu Tyr Ile Gln Ser
        35                  40                  45

His Asp Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
    50                  55                  60
```

```
Lys Asn Met Ala Pro Glu Tyr Val Lys Ala Ala Glu Thr Leu Val Glu
65                  70                  75                  80

Lys Asn Ile Thr Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Asn Gln Asp Leu
                85                  90                  95

Cys Met Glu His Asn Ile Pro Gly Phe Pro Ser Leu Lys Ile Phe Lys
            100                 105                 110

Asn Ser Asp Val Asn Asn Ser Ile Asp Tyr Glu Gly Pro Arg Thr Ala
        115                 120                 125

Glu Ala Ile Val Gln Phe Met Ile Lys Gln Ser Gln Pro Ala Val Ala
    130                 135                 140

Val Val Ala Asp Leu Pro Ala Tyr Leu Ala Asn Glu Thr Phe Val Thr
145                 150                 155                 160

Pro Val Ile Val Gln Ser Gly Lys Ile Asp Ala Asp Phe Asn Ala Thr
                165                 170                 175

Phe Tyr Ser Met Ala Asn Lys His Phe Asn Asp Tyr Asp Phe Val Ser
            180                 185                 190

Ala Glu Asn Ala Asp Asp Asp Phe Lys Leu Ser Ile Tyr Leu Pro Ser
        195                 200                 205

Ala Met Asp Glu Pro Val Val Tyr Asn Gly Lys Lys Ala Asp Ile Ala
    210                 215                 220

Asp Ala Asp Val Phe Glu Lys Trp Leu Gln Val Glu Ala Leu Pro Tyr
225                 230                 235                 240

Phe Gly Glu Ile Asp Gly Ser Val Phe Ala Gln Tyr Val Glu Ser Gly
                245                 250                 255

Leu Pro Leu Gly Tyr Leu Phe Tyr Asn Asp Glu Glu Glu Leu Glu Glu
            260                 265                 270

Tyr Lys Pro Leu Phe Thr Glu Leu Ala Lys Lys Asn Arg Gly Leu Met
        275                 280                 285

Asn Phe Val Ser Ile Asp Ala Arg Lys Phe Gly Arg His Ala Gly Asn
    290                 295                 300

Leu Asn Met Lys Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Met Thr
305                 310                 315                 320

Glu Asp Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Ser Glu Glu Ala Phe Asp
```

325 330 335

Glu Leu Ser Asp Lys Ile Val Leu Glu Ser Lys Ala Ile Glu Ser Leu
340 345 350

Val Lys Asp Phe Leu Lys Gly Asp Ala Ser Pro Ile Val Lys Ser Gln
355 360 365

Glu Ile Phe Glu Asn Gln Asp Ser Ser Val Phe Gln Leu Val Gly Lys
370 375 380

Asn His Asp Glu Ile Val Asn Asp Pro Lys Lys Asp Val Leu Val Leu
385 390 395 400

Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala Pro Thr Tyr
405 410 415

Gln Glu Leu Ala Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Thr Ser Asp Val Leu Ile
420 425 430

Ala Lys Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Arg Gly Val Val Ile Glu
435 440 445

Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Gly Gly Lys Lys Ser Glu Ser
450 455 460

Val Val Tyr Gln Gly Ser Arg Ser Leu Asp Ser Leu Phe Asp Phe Ile
465 470 475 480

Lys Glu Asn Gly His Phe Asp Val Asp Gly Lys Ala Leu Tyr Glu Glu
485 490 495

Ala Gln Glu Lys Ala Ala Glu Glu Ala Asp Ala Asp Ala Glu Leu Ala
500 505 510

Asp Glu Glu Asp Ala Ile His Asp Glu Leu
515 520

<210> 4
<211> 259
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 4

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Gln Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
                165                 170                 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
            180                 185                 190

Glu Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
        195                 200                 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Gln Gly Arg Val Arg
225                 230                 235                 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
                245                 250                 255

Val Ser Ser
```

<210> 5
<211> 245
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 5

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
            20                  25                  30

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
    130                 135                 140

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
145                 150                 155                 160

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                165                 170                 175

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
            180                 185                 190

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
        195                 200                 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
225                 230                 235                 240

Val Thr Val Ser Ser
                245
```

<210> 6
<211> 385
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 6

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp Tyr Arg Lys
            100                 105                 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
            180                 185                 190
```

```
Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
        195                 200                 205

Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
    210                 215                 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
225                 230                 235                 240

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            260                 265                 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        275                 280                 285

Ser Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
    290                 295                 300

Glu Phe Val Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                325                 330                 335

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
            340                 345                 350

Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp
        355                 360                 365

Tyr Arg Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    370                 375                 380

Ser
385
```

<210> 7
<211> 261
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 7

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp Tyr Arg Lys
            100                 105                 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser
            180                 185                 190

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
        195                 200                 205

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
    210                 215                 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr
225                 230                 235                 240

Leu Ser Arg Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                245                 250                 255

Val Thr Val Ser Ser
            260
```

<210> 8
<211> 408
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 8

```
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Val Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Asn Trp Arg Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Gly Thr Pro Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser
            100                 105                 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
    130                 135                 140

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr Val Leu Gly
                165                 170                 175

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
            180                 185                 190

Asn Trp Arg Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg
        195                 200                 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met
    210                 215                 220
```

```
Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly
225                 230                 235                 240

Thr Pro Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr
                245                 250                 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
    290                 295                 300

Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr Val Leu Gly Trp Phe Arg
305                 310                 315                 320

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Trp Arg
                325                 330                 335

Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile
            340                 345                 350

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        355                 360                 365

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly Thr Pro Leu
    370                 375                 380

Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
385                 390                 395                 400

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                405
```

<210> 4
<211> 398
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 9

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr
```

```
          20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser
            100                 105                 110

Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
    130                 135                 140

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
                165                 170                 175

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
            180                 185                 190

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
        195                 200                 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
225                 230                 235                 240

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
        275                 280                 285
```

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu
290 295 300

Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg
305 310 315 320

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly
325 330 335

Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
340 345 350

Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
355 360 365

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser
370 375 380

Pro Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
385 390 395

<210> 10
<211> 386
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
35 40 45

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser
50 55 60

Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro

```
                100                 105                 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                 150                 155                 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
            180                 185                 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
            260                 265                 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser
        275                 280                 285

Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
    290                 295                 300

Phe Val Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
305                 310                 315                 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
                325                 330                 335

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
            340                 345                 350

Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu
        355                 360                 365
```

Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
370 375 380

Ser Ser
385

<210> 11
<211> 386
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
35 40 45

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser
50 55 60

Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro
100 105 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr

```
                180                 185                 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
            260                 265                 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser
        275                 280                 285

Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
    290                 295                 300

Phe Val Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
305                 310                 315                 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
                325                 330                 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
            340                 345                 350

Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu
        355                 360                 365

Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    370                 375                 380

Ser Ser
385
```

<210> 12
<211> 398
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 12

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser
            100                 105                 110

Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
    130                 135                 140

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
                165                 170                 175

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
            180                 185                 190

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
        195                 200                 205

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
225                 230                 235                 240

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
```

260 265 270

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
275 280 285

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu
290 295 300

Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg
305 310 315 320

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Glu Ser Gly
325 330 335

Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
340 345 350

Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
355 360 365

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser
370 375 380

Pro Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
385 390 395

<210> 13
<211> 386
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Nanocuerpo
<400> 13

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
35 40 45

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser
50 55 60

Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

```
Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
                85                  90                  95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro
            100                 105                 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                 150                 155                 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
            180                 185                 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
            260                 265                 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser
        275                 280                 285

Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
    290                 295                 300

Phe Val Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
305                 310                 315                 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
                325                 330                 335

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
```

```
            340                 345                 350

Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu
        355                 360                 365

Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    370                 375                 380

Ser Ser
385
```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir, en una levadura, un anticuerpo de dominio capaz de formar una unidad de unión a antígeno única y caracterizado por un nivel reducido o ausencia de una variante de anticuerpo de dominio que carece de al menos un enlace disulfuro, que comprende

I) aplicar condiciones que promuevan la formación de puentes disulfuro en anticuerpos de dominio, o

II) retirar los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro aplicando condiciones seleccionadas de

i) unión de anticuerpos de dominio que comprenden grupos tiol libres a grupos reactivos adecuados, opcionalmente en condiciones desnaturalizantes; y

ii) cromatografía de alta resolución en fase inversa, o

III) una combinación de (I) y (II);

en el que las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro se seleccionan de una o más de las siguientes:

a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;

b) potenciación de la expresión de una proteína disulfuro isomerasa (PDI) con una secuencia de control adecuada o aumentando la dosis génica;

c) adaptación de las condiciones de cultivo mediante uno o más seleccionados de los siguientes: rebajar la temperatura de cultivo y/u optimizar el medio de cultivo, mediante uno o más seleccionados de los siguientes: reducción de la alimentación de metanol para hospedadores que requieran una alimentación de metanol, rebaja de la conductividad del medio de cultivo o cualquier combinación de los mismos;

d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de tampón rédox, preferiblemente en presencia adicional de desnaturalizante;

e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de temperatura, aumento del pH o alta presión, o cualquier combinación de los mismos, y

f) combinaciones de cualquiera de a) a e).

2. Procedimiento para producir, en una levadura, un anticuerpo de dominio capaz de formar una unidad de unión a antígeno única y que comprende

I) aplicar condiciones que promuevan la formación de puentes disulfuro en anticuerpos de dominio, o

II) retirar los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro aplicando condiciones seleccionadas de

i) unir anticuerpos de unión que comprenden grupos tiol a grupos reactivos adecuados, opcionalmente en condiciones desnaturalizantes; y

ii) cromatografía de alta resolución en fase inversa, o

III) una combinación de (I) y (II);

en el que las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro se seleccionan de una o más de las siguientes:

a) adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+, a al menos una etapa de producción seleccionada de: caldo de cultivo después de la fermentación, sobrenadante que comprende el anticuerpo de dominio después de la retirada del hospedador, cualquier etapa después de la purificación del anticuerpo de dominio o el anticuerpo de dominio purificado;

o

adición de agentes oxidantes, preferiblemente iones metálicos oxidantes, a una concentración final de 0,15 a 10 mM, preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+;

o

adición de Cu2+ a una concentración final de 0,1 a 10 mM;

b) potenciación de la expresión de una proteína disulfuro isomerasa (PDI) con un promotor de control adecuado o aumentado la dosis génica;

c) adaptación de las condiciones de cultivo mediante uno o más seleccionados de los siguientes: rebaja de la temperatura de cultivo a 25 ºC, reducción de la alimentación de metanol para *Pichia* a ≤ 5 ml/l·h, rebaja de la conductividad del medio de cultivo a ≤ 28 mS/cm, o cualquier combinación de los mismos;

d) replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de tampón rédox, preferiblemente en presencia adicional de desnaturalizante;

e) tratamiento del anticuerpo de dominio por oxigenación, aumento de temperatura a 40-60 ºC, aumento del pH a 8-9, o cualquier combinación de los mismos; y

f) combinaciones de cualquiera de a) a e).

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que se añade un agente oxidante, preferiblemente iones metálicos oxidantes, más preferiblemente uno o más seleccionados de Cu2+, Fe2+, Fe3+ y Zn2+, a al menos una etapa de producción del anticuerpo de dominio, preferiblemente seleccionada de: cultivo del hospedador para producir el anticuerpo de dominio, sobrenadante de cultivo que comprende el anticuerpo de dominio después de la retirada del hospedador, cualquier etapa de purificación del anticuerpo de dominio y el anticuerpo de dominio purificado.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha proteína disulfuro isomerasa se selecciona de calsecuestrina y otras proteínas relacionadas con PDI que comprenden, pero sin limitación, ERp72, ERp57, ERp60, ERp44, ERp5, ERp27 y PDIR.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se efectúa el replegamiento del anticuerpo de dominio en presencia de desnaturalizante y tampón rédox usando clorhidrato de guanidinio 2 M y cistamina:cisteamina 1:5 mM/mM.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se trata el anticuerpo de dominio aumentando la temperatura a 55 ºC y aumentando el pH a pH 8-9, opcionalmente combinado con oxigenación por purgado con oxígeno.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se fija el anticuerpo de dominio a una fase estacionaria de una columna cromatográfica.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo de dominio es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que consiste en una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende al menos las etapas de cultivar el hospedador para producir el anticuerpo de dominio que comprenden:
a) cultivar dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique;
b) mantener el hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el anticuerpo de dominio; opcionalmente seguido de:
c) aislar y/o purificar el anticuerpo de dominio secretado a partir del medio.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que se aplican las condiciones que promueven la formación de puentes disulfuro en una o más de la etapa a), etapa b), después de la etapa b) o en o después de la etapa c).

11. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que se aplican las condiciones que retiran los anticuerpos de dominio que carecen de al menos un puente disulfuro después de la etapa b).

Fig 1

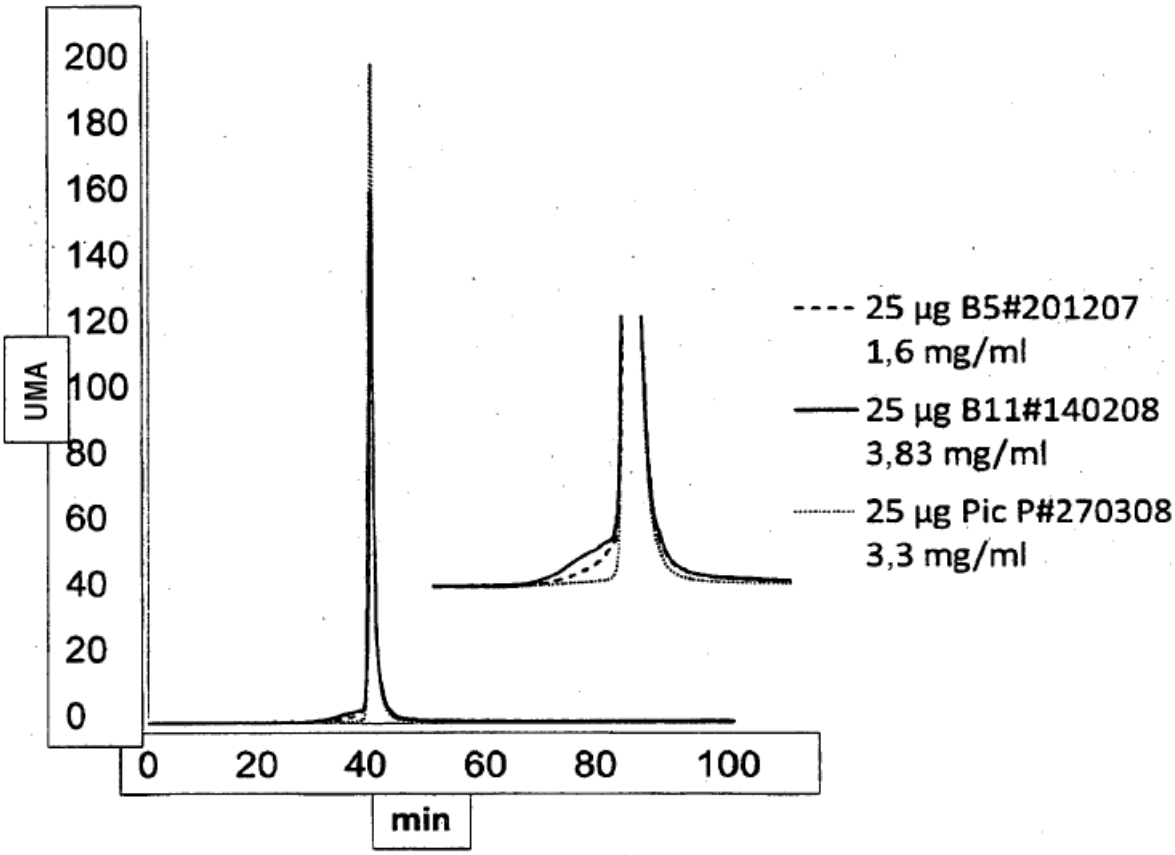

UMA
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
min
25 µg B5#201207
1,6 mg/ml
25 µg B11#140208
3,83 mg/ml
25 µg Pic P#270308
3,3 mg/ml

Fig 2

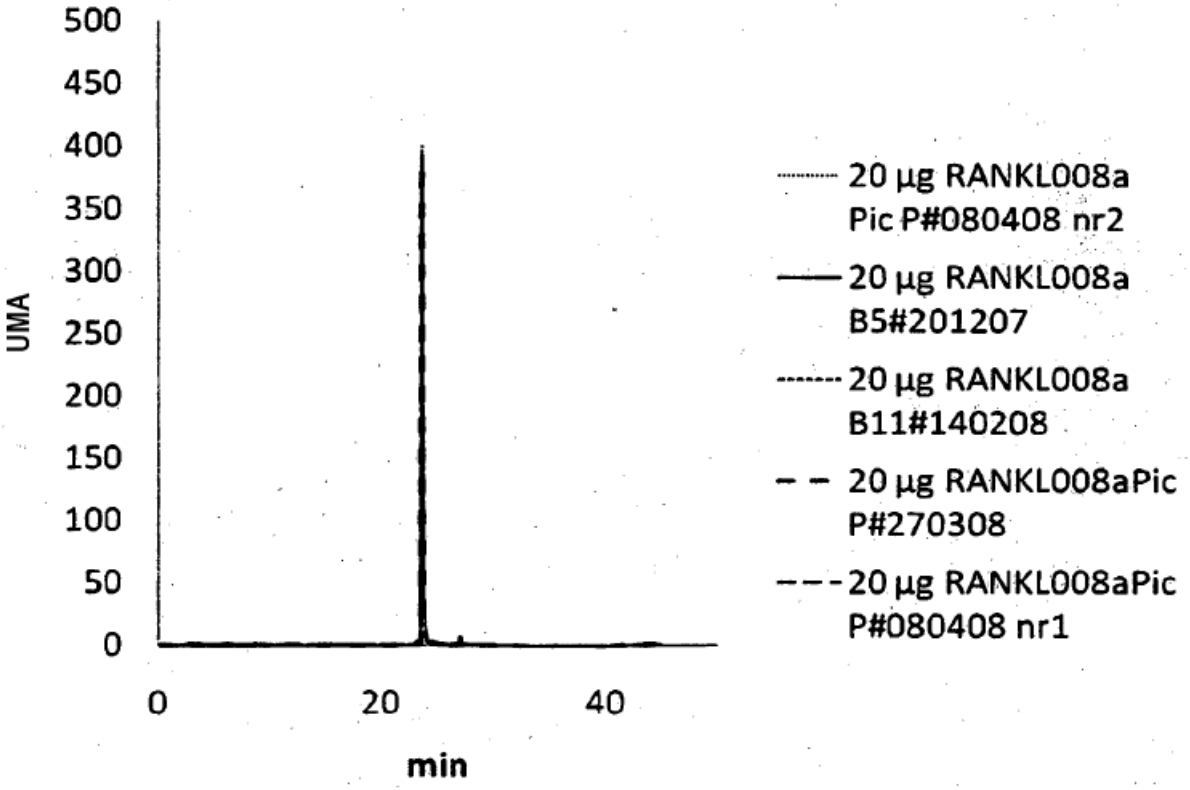

500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
UMA
0
20
40
min
20 µg RANKL008a Pic P#080408 nr2
20 µg RANKL008a B5#201207
20 µg RANKL008a B11#140208
20 µg RANKL008aPic P#270308
20 µg RANKL008aPic P#080408 nr1

Fig 3

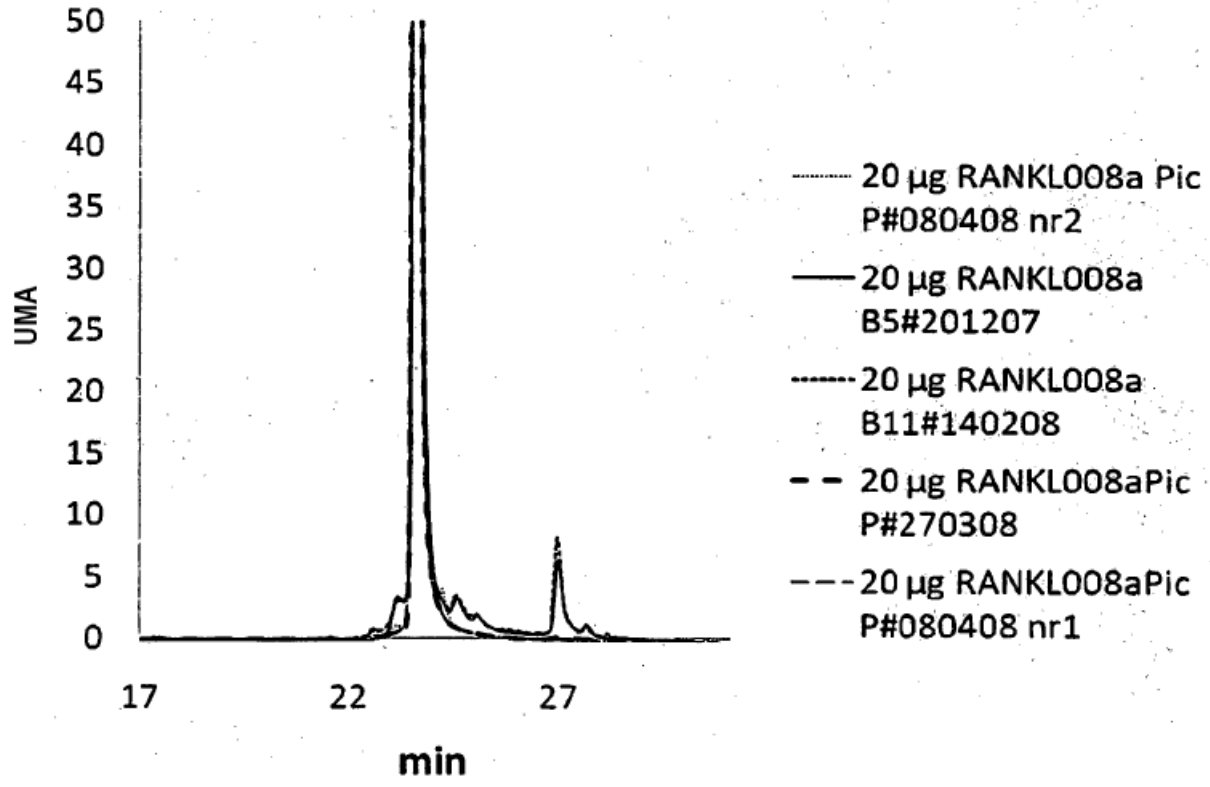

UMA
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
17
22
27
min
20 µg RANKL008a Pic P#080408 nr2
20 µg RANKL008a B5#201207
20 µg RANKL008a B11#140208
20 µg RANKL008aPic P#270308
20 µg RANKL008aPic P#080408 nr1

Fig 4

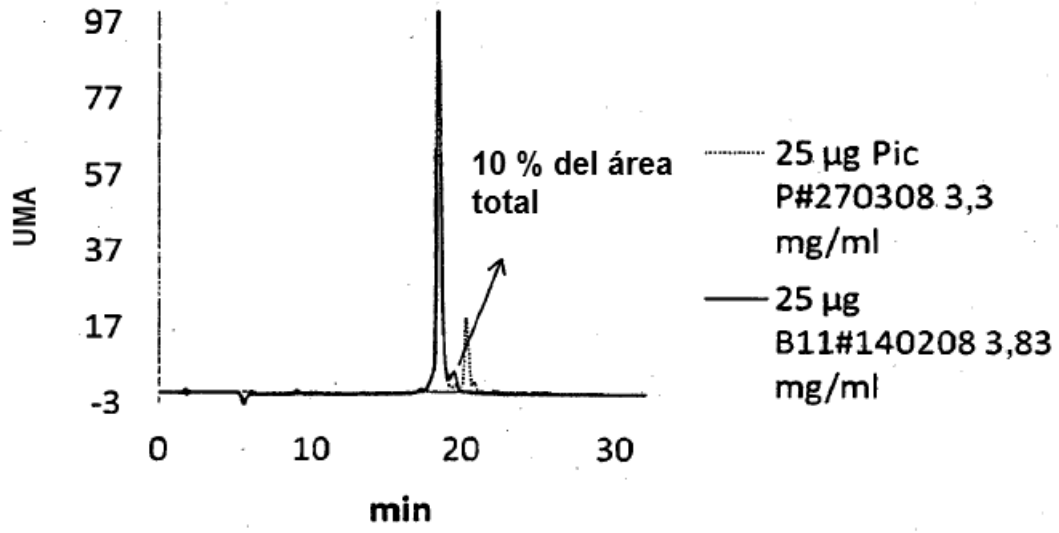

97
77
57
37
17
-3
UMA
0
10
20
30
min
10 % del área total
25 µg Pic P#270308 3,3 mg/ml
25 µg B11#140208 3,83 mg/ml

Fig 5

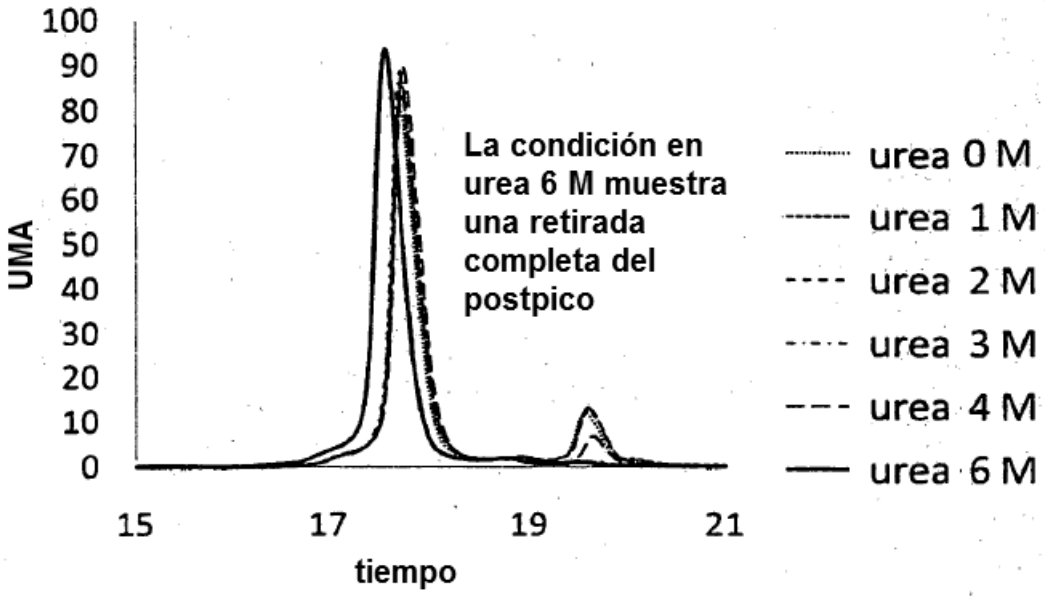

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
UMA
15
17
19
21
tiempo
La condición en urea 6 M muestra una retirada completa del postpico
urea 0 M
urea 1 M
urea 2 M
urea 3 M
urea 4 M
urea 6 M

Fig 6

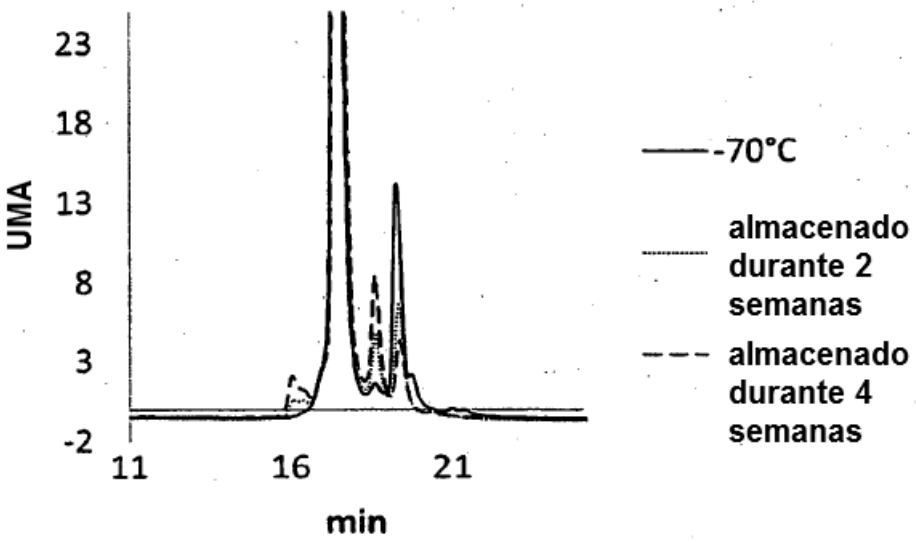

23
18
13
8
3
-2
UMA
11
16
21
min
-70°C
almacenado durante 2 semanas
almacenado durante 4 semanas

Fig 7

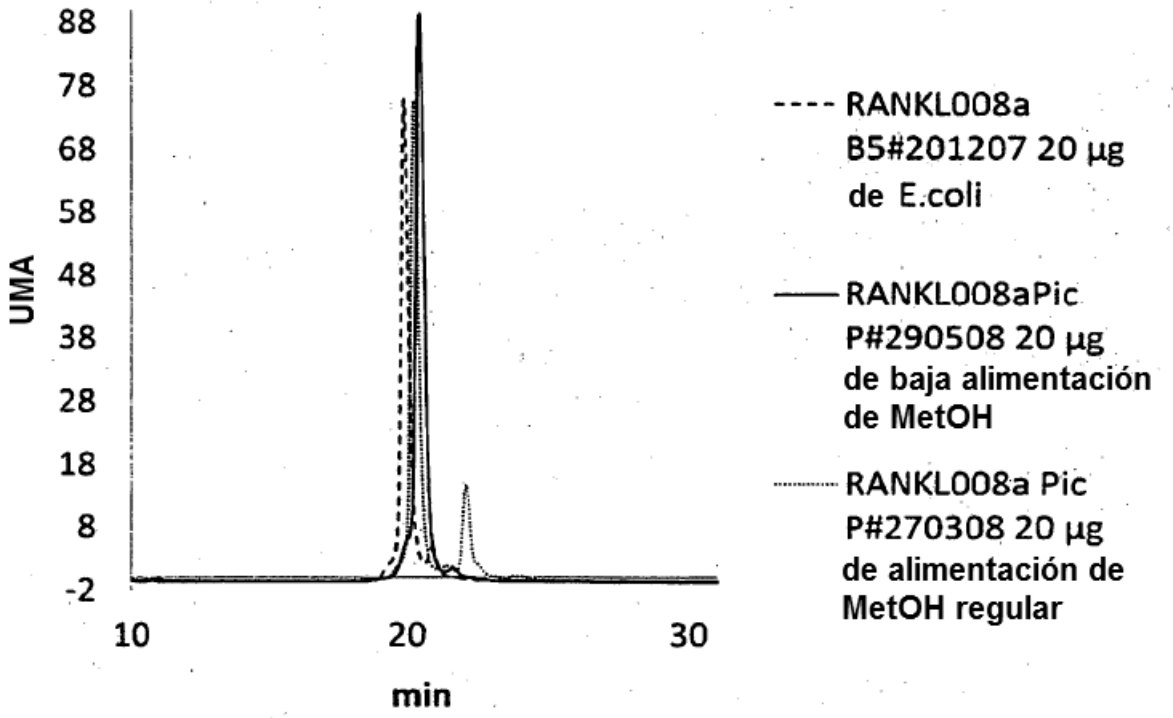

88
78
68
58
48
38
28
18
8
-2
UMA
10
20
30
min
RANKL008a B5#201207 20 µg de E.coli
RANKL008aPic P#290508 20 µg de baja alimentación de MetOH
RANKL008a Pic P#270308 20 µg de alimentación de MetOH regular

Fig 8

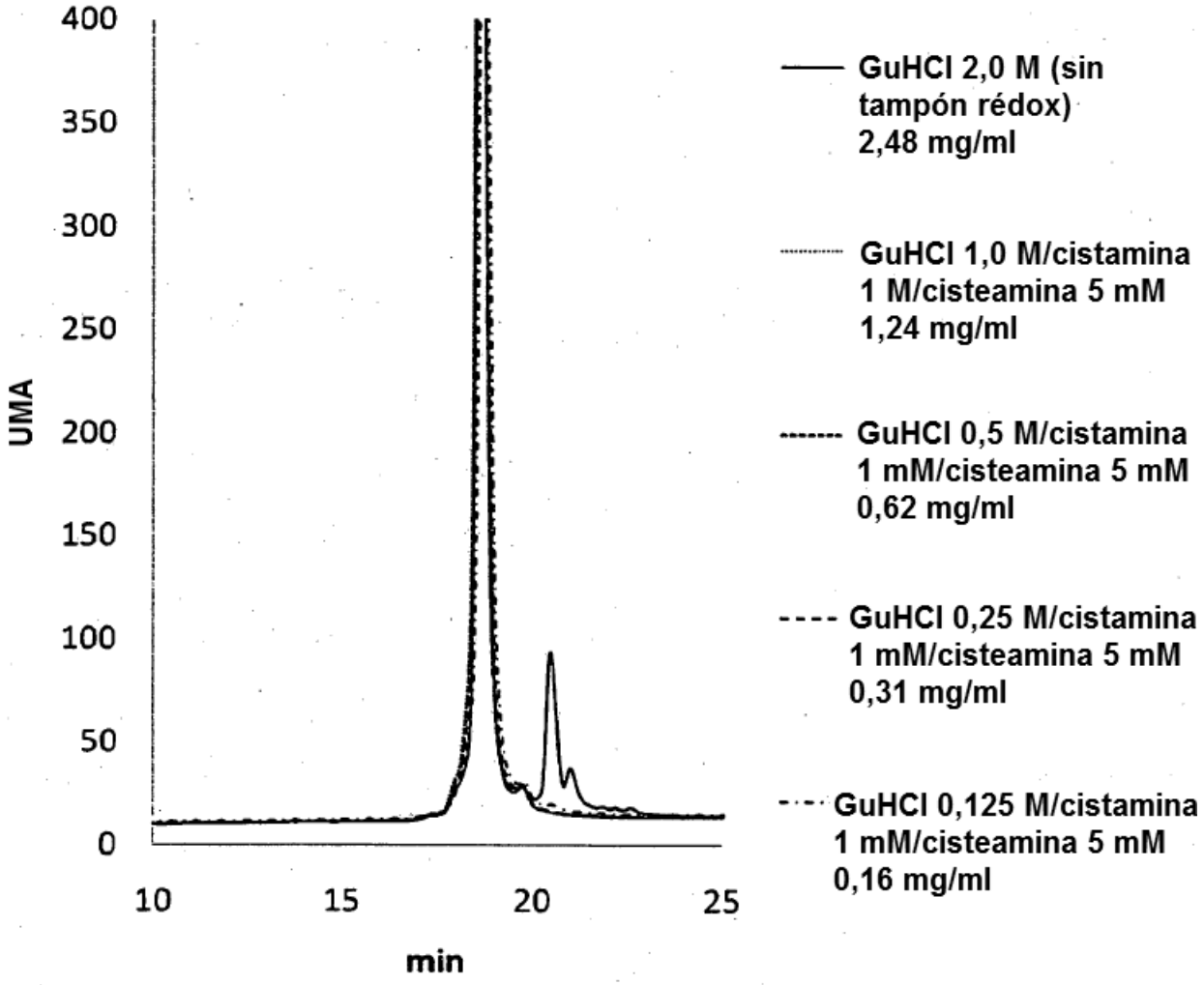

400
350
300
250
200
150
100
50
0
UMA
10
15
20
25
min
GuHCl 2,0 M (sin tampón rédox) 2,48 mg/ml
GuHCl 1,0 M/cistamina 1 M/cisteamina 5 mM 1,24 mg/ml
GuHCl 0,5 M/cistamina 1 mM/cisteamina 5 mM 0,62 mg/ml
GuHCl 0,25 M/cistamina 1 mM/cisteamina 5 mM 0,31 mg/ml
GuHCl 0,125 M/cistamina 1 mM/cisteamina 5 mM 0,16 mg/ml

Fig 9

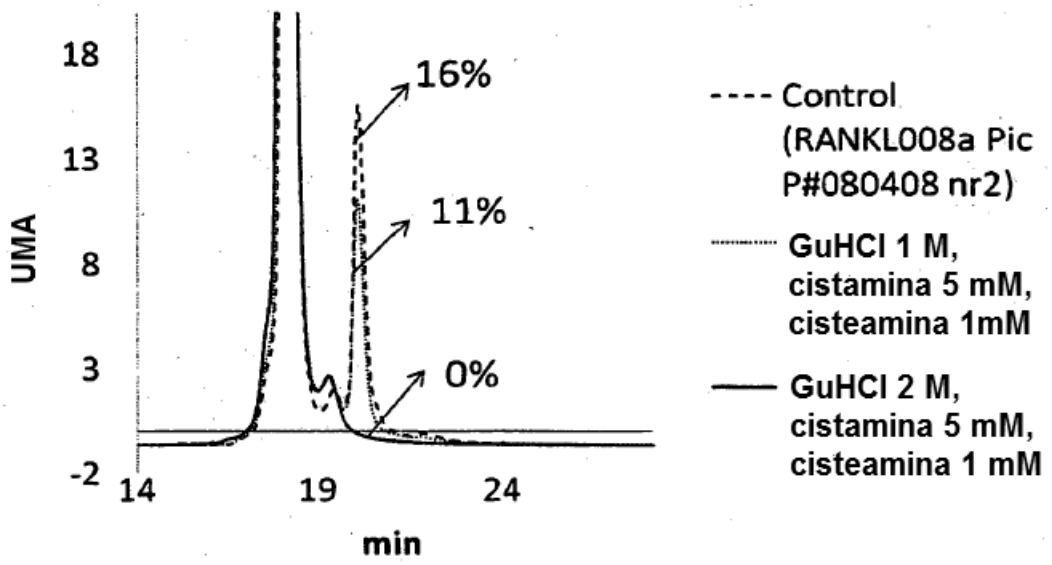

18
13
8
3
-2
UMA
14
19
24
min
16%
11%
0%
---- Control (RANKL008a Pic P#080408 nr2)
GuHCl 1 M, cistamina 5 mM, cisteamina 1mM
GuHCl 2 M, cistamina 5 mM, cisteamina 1 mM

Fig 10

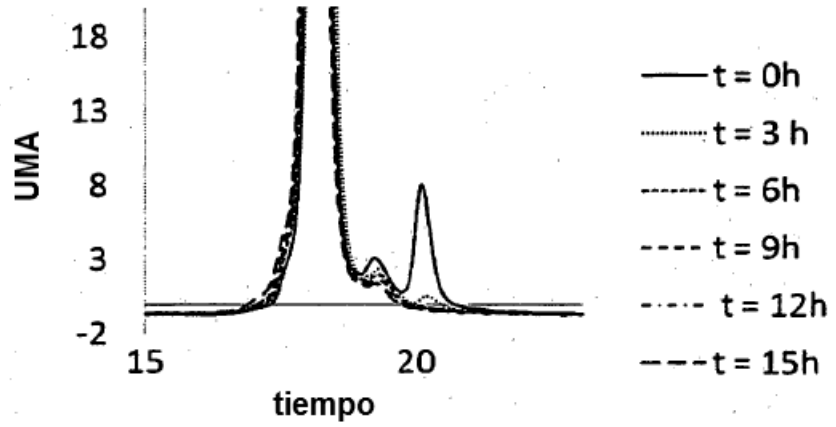


Fig 11

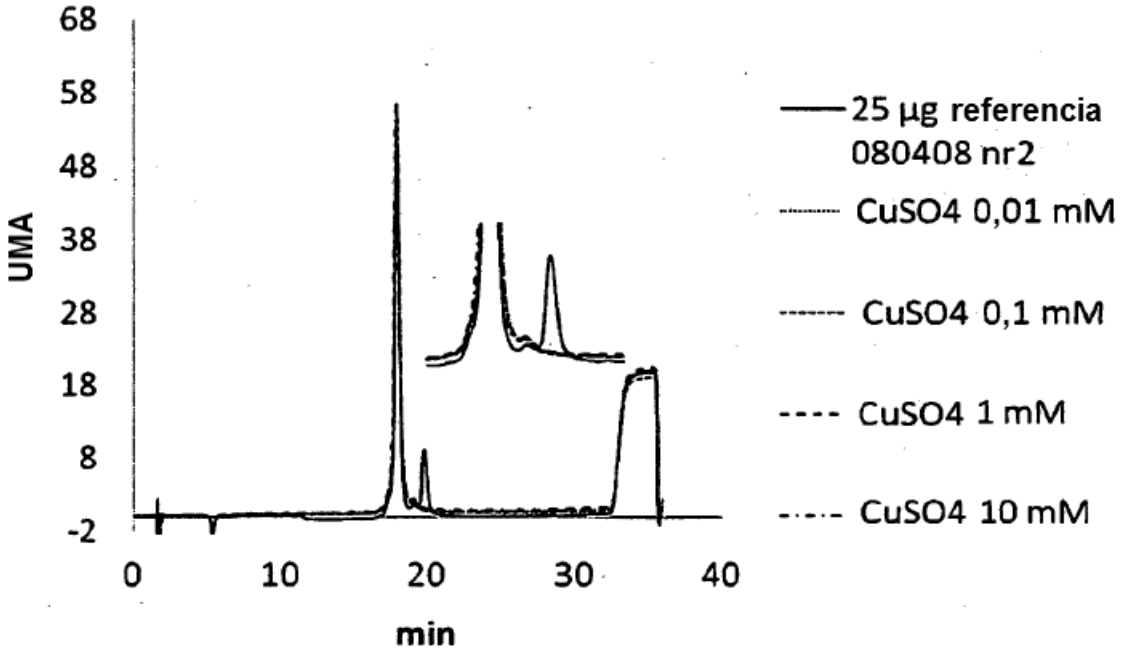

68
58
48
38
28
18
8
-2
UMA
0
10
20
30
40
min
25 µg referencia 080408 nr2
CuSO4 0,01 mM
CuSO4 0,1 mM
CuSO4 1 mM
CuSO4 10 mM

Fig 12

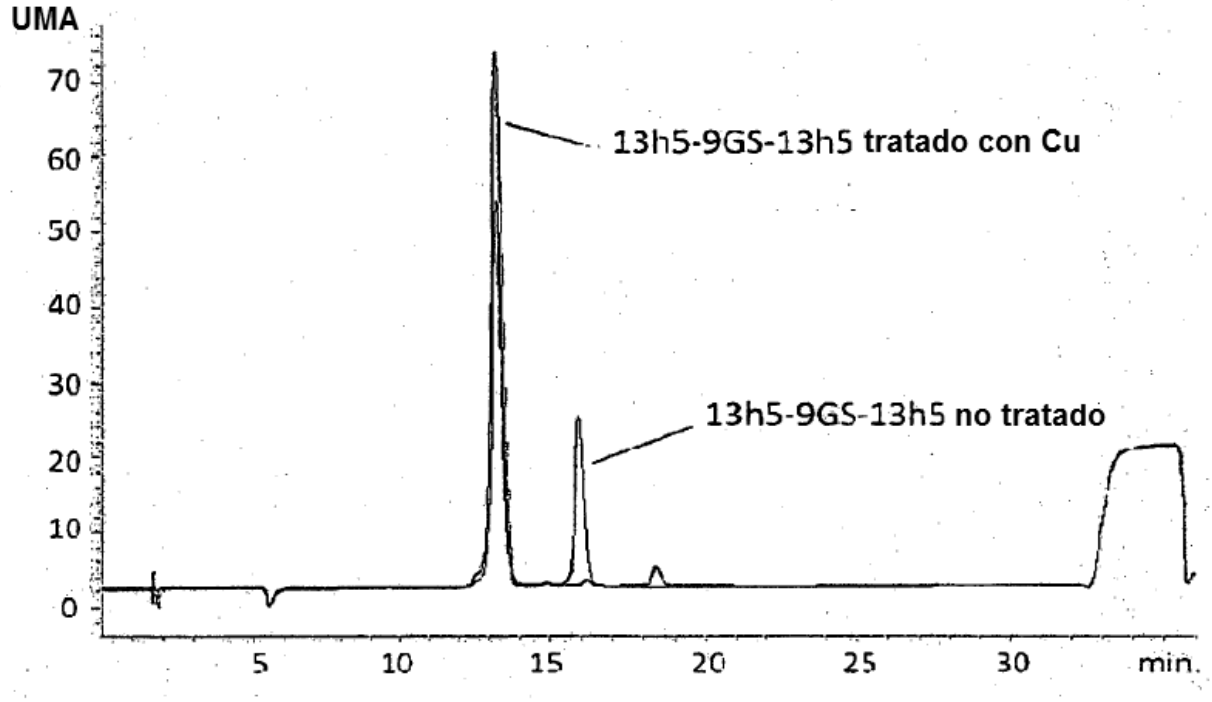

UMA
70
60
50
40
30
20
10
0
13h5-9GS-13h5 tratado con Cu
13h5-9GS-13h5 no tratado
5
10
15
20
25
30
min.

Fig 13

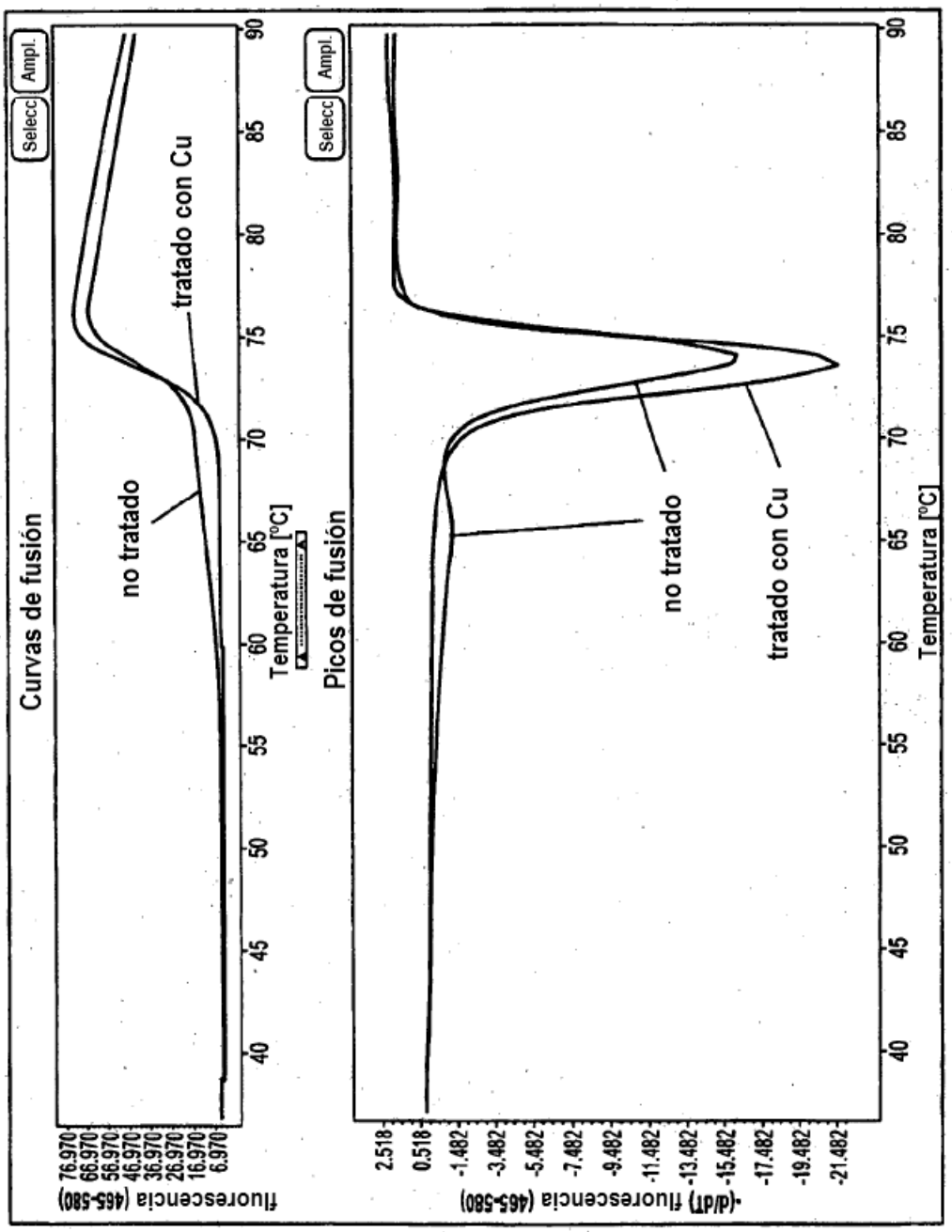

Curvas de fusión
Selecc
Ampl.
no tratado
tratado con Cu
fluorescencia (465-580)
76.970
66.970
56.970
46.970
36.970
26.970
16.970
6.970
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
Temperatura [°C]
Picos de fusión
Selecc
Ampl.
no tratado
tratado con Cu
-(d/dT) fluorescencia (465-580)
2.518
0.518
-1.482
-3.482
-5.482
-7.482
-9.482
-11.482
-13.482
-15.482
-17.482
-19.482
-21.482
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
Temperatura [°C]

Fig 14

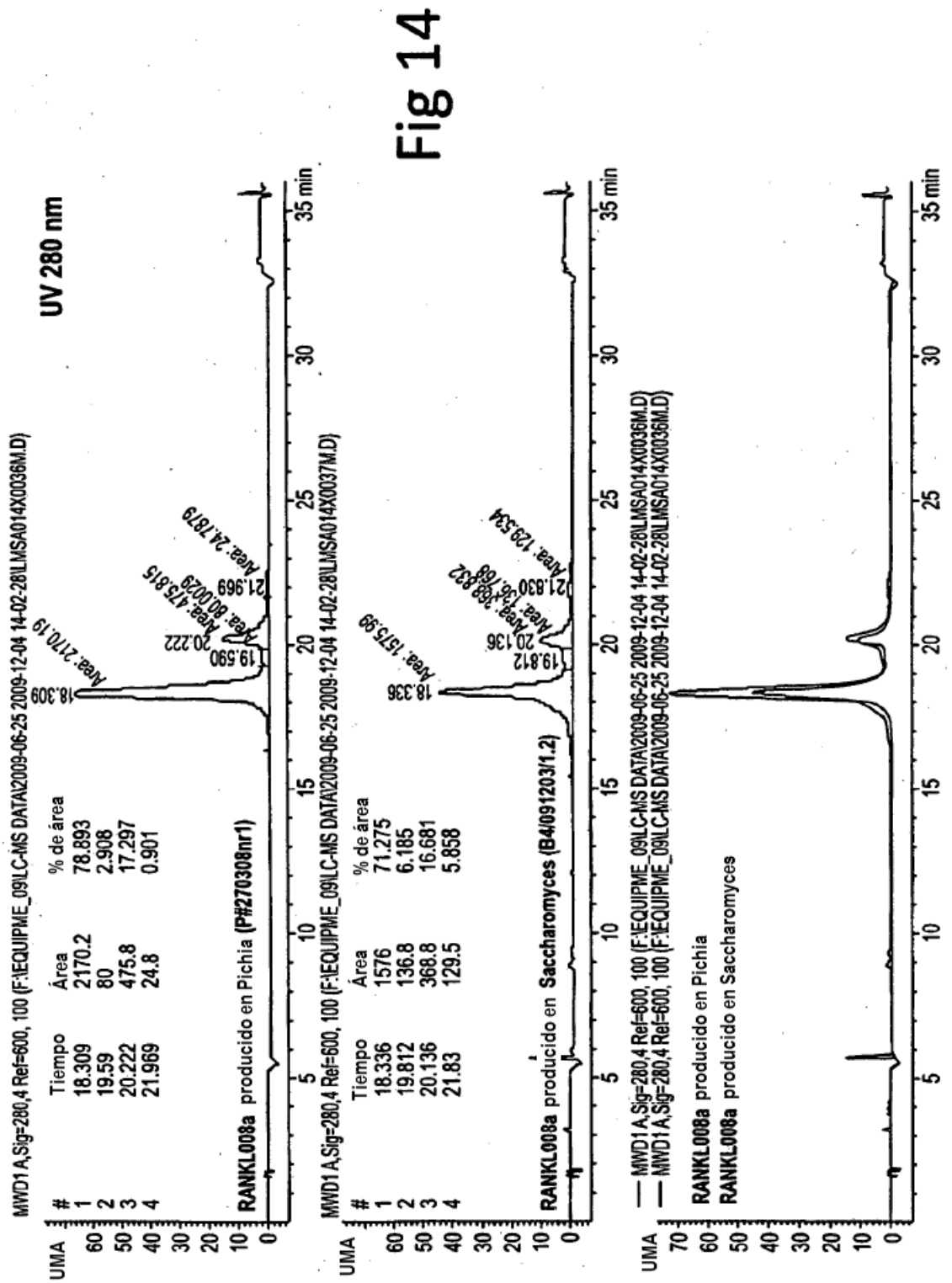

UV 280 nm
MWD1 A,Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME_09\LC-MS DATA\2009-06-25 2009-12-04 14-02-28\LMSA014X0036M.D)
Tiempo Área % de área
1 18.309 2170.2 78.893
2 19.59 80 2.908
3 20.222 475.8 17.297
4 21.969 24.8 0.901
RANKL008a producido en Pichia (P#270308nr1)
Area: 2170.19
Area: 475.815
Area: 80.0029
Area: 24.7879
18.309
19.590
20.222
21.969
UMA
35 min
MWD1 A,Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME_09\LC-MS DATA\2009-06-25 2009-12-04 14-02-28\LMSA014X0037M.D)
Tiempo Área % de área
1 18.336 1576 71.275
2 19.812 136.8 6.185
3 20.136 368.8 16.681
4 21.83 129.5 5.858
RANKL008a producido en Saccharomyces (B4/091203/1.2)
Area: 1575.99
Area: 368.802
Area: 136.168
Area: 129.534
18.336
19.812
20.136
21.830
MWD1 A,Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME_09\LC-MS DATA\2009-06-25 2009-12-04 14-02-28\LMSA014X0036M.D)
MWD1 A,Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME_09\LC-MS DATA\2009-06-25 2009-12-04 14-02-28\LMSA014X0037M.D)
RANKL008a producido en Pichia
RANKL008a producido en Saccharomyces

Fig 15

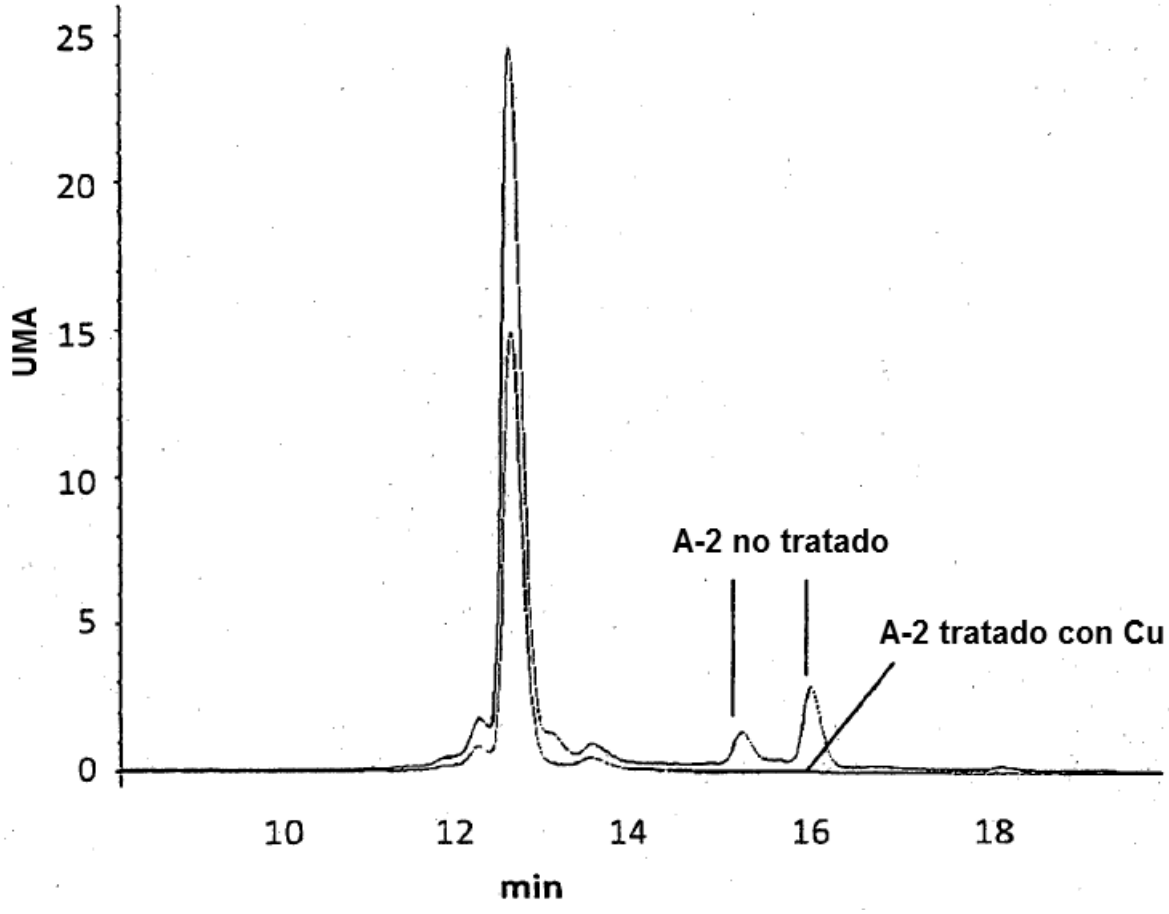

25
20
15
10
5
0
UMA
A-2 no tratado
A-2 tratado con Cu
10
12
14
16
18
min

Fig 16

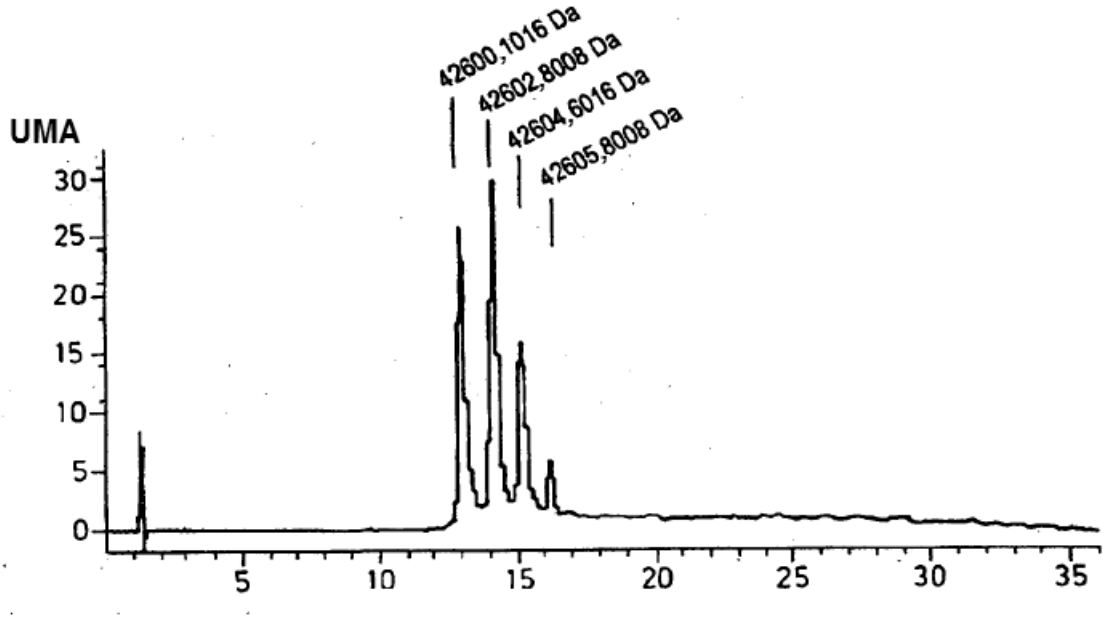

42600,1016 Da
42602,8008 Da
42604,6016 Da
42605,8008 Da
UMA
30
25
20
15
10
5
0
5
10
15
20
25
30
35

Fig 17

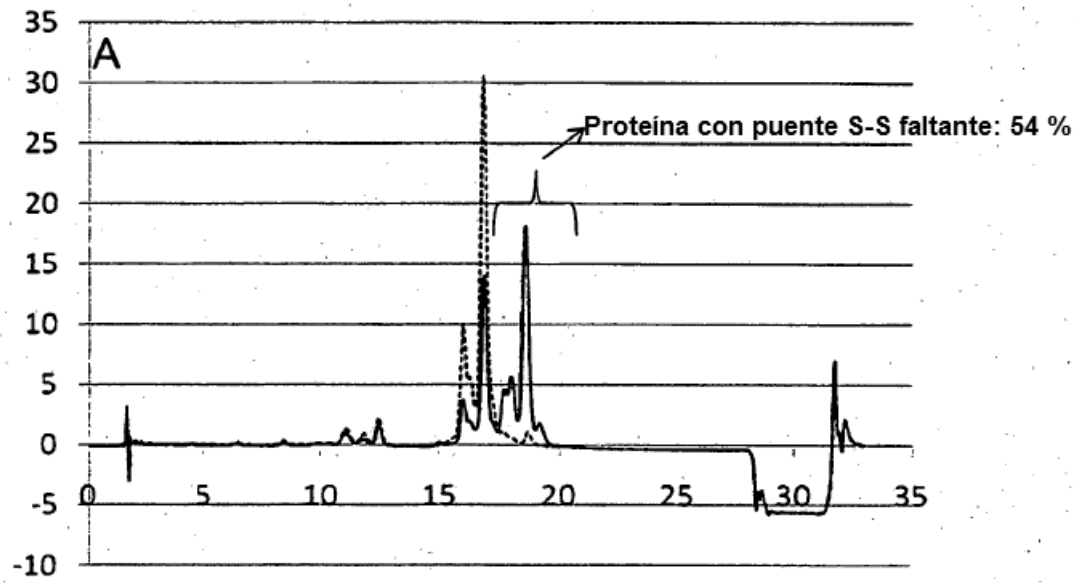

A
Proteína con puente S-S faltante: 54 %
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0
5
10
15
20
25
30
35

Fig 17a

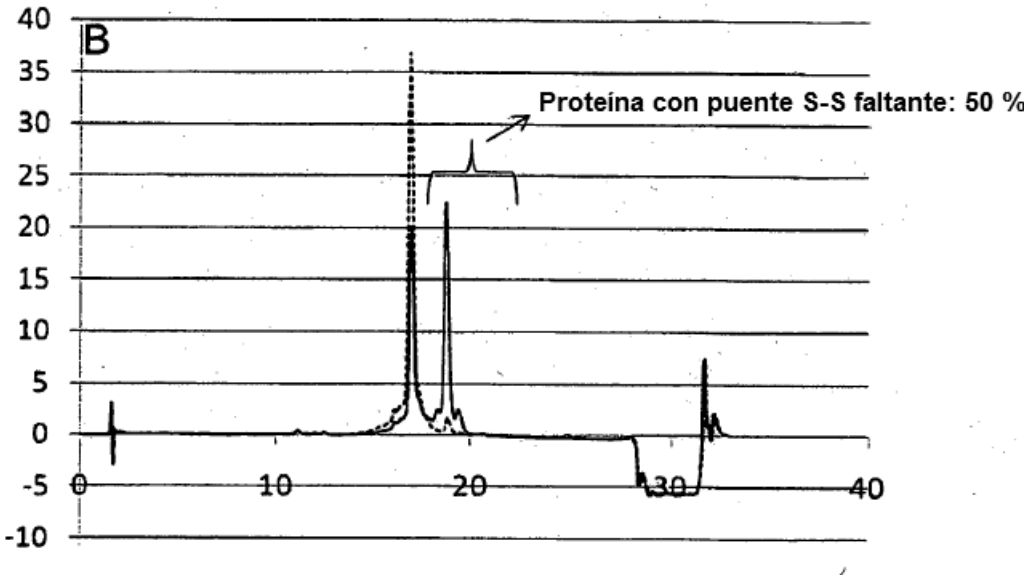

B
Proteína con puente S-S faltante: 50 %
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0
10
20
30
40

Fig 17 b

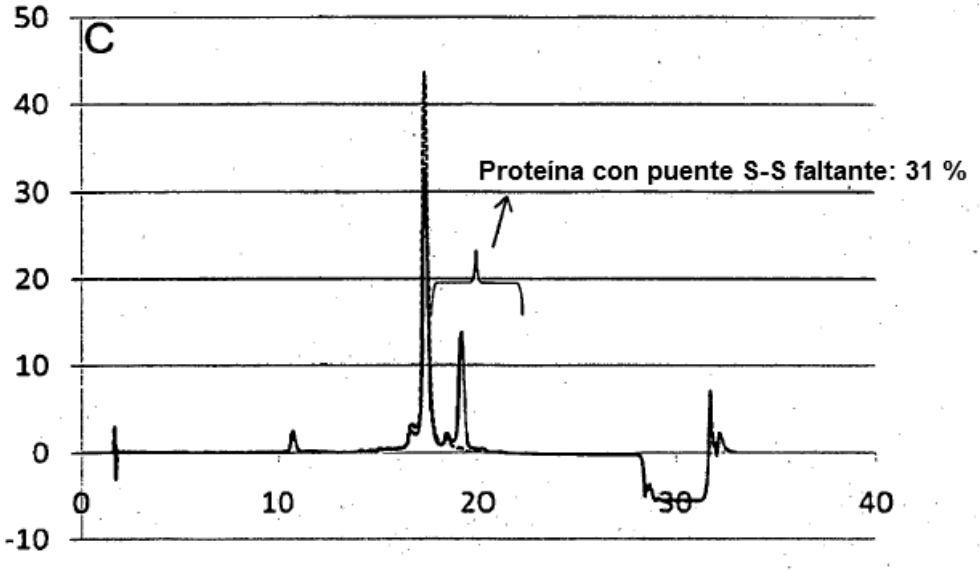

C
Proteína con puente S-S faltante: 31 %
50
40
30
20
10
0
-10
0
10
20
30
40

Fig 17c

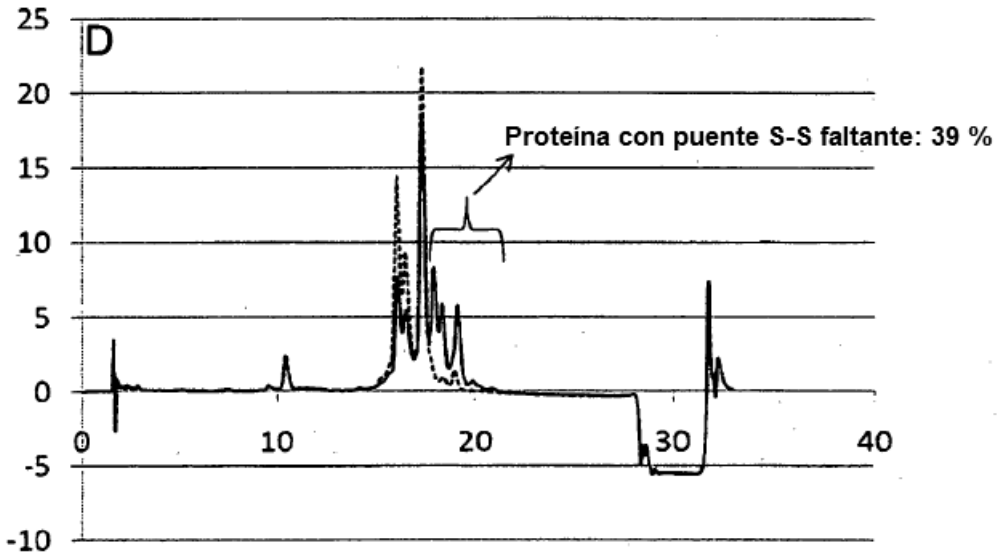
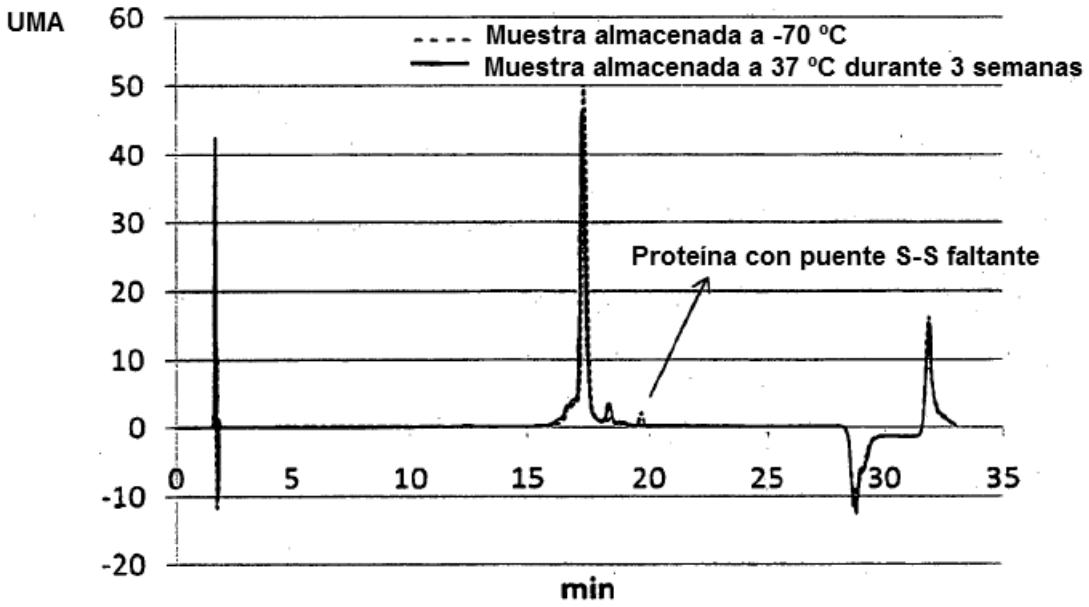

D
Proteína con puente S-S faltante: 39 %
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0
10
20
30
40

Fig 18


UMA
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
0
5
10
15
20
25
30
35
min
Muestra almacenada a -70 ºC
Muestra almacenada a 37 ºC durante 3 semanas
Proteína con puente S-S faltante