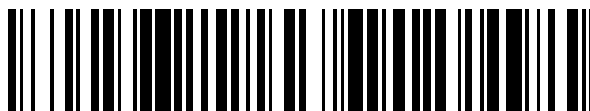


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 751**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14764393 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2971037**

54 Título: **Cambio de temperatura para una expresión con mayor rendimiento de polipéptidos en levaduras y otras células transformadas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791471 P

15.03.2013 US 201361790613 P

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

23.03.2020

73 Titular/es:

**ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
11804 North Creek Parkway South
Bothell, WA 98011, US**

72 Inventor/es:

**LESNICKI, GARY;
MCNEILL, PATRICIA, DIANNE;
HARTNER, FRANZ y
YOUNG, MARK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 749 751 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cambio de temperatura para una expresión con mayor rendimiento de polipéptidos en levaduras y otras células transformadas

Esta solicitud incluye como parte de esta descripción un listado de secuencias biológicas.

5 **Campo**

La presente descripción se refiere generalmente a métodos para producir proteínas deseadas en levaduras y otras células. En la descripción se incluyen métodos que pueden usarse para expresar proteínas con subunidades únicas o múltiples, que incluyen anticuerpos. En métodos ejemplares, las células son una levadura, tal como *Pichia pastoris*. Los ejemplos de los métodos objeto pueden producir anticuerpos u otras proteínas deseadas con un rendimiento aumentado en comparación con los métodos convencionales. Adicionalmente, esta descripción se refiere al área de la fermentación. En particular, se refiere a la fermentación de células de levaduras recombinantes.

Antecedentes

Varias proteínas producidas de forma recombinante han recibido la aprobación reguladora para el uso terapéutico en seres humanos. Un número creciente de estas proteínas terapéuticas son producidas en sistemas de expresión microbianos. De hecho, de acuerdo con una revisión reciente, los sistemas de expresión microbianos se usan para la producción de casi la mitad de los 151 fármacos recombinantes basados en proteínas con licencia hasta enero de 2009 de acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. o la Agencia de Medicamentos Europea (Ferrer-Miralles et al., *Microbial Cell Factories* 2009, 8:17).

Entre estas proteínas producidas de forma recombinante hay anticuerpos, los cuales convencionalmente son proteínas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Cientos de anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAb) se encuentran actualmente en el mercado o en desarrollo. La producción de anticuerpos funcionales generalmente implica la síntesis de las dos cadenas polipeptídicas, así como un número de eventos postraduccionales, que incluyen el procesamiento proteolítico de la secuencia señal de secreción N-terminal; plegamiento y ensamblaje adecuados de los polipéptidos en tetrámeros; formación de puentes disulfuro; y típicamente incluye una glicosilación ligada a N específica.

La levadura *Pichia pastoris* ha sido previamente usada como un huésped de producción para la fabricación de proteínas recombinantes de utilidad terapéutica. Los ejemplos incluyen la producción de albúmina sérica humana y el inhibidor de calicreína, Ecalantide (Reichert, J. *mAbs* 4:3 1-3, 2012). *Pichia pastoris* se ha usado para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes que tienen cadenas pesadas y ligeras ensambladas correctamente (Patente de los EE.UU. 7.927.863). El promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) puede dirigir la expresión de un anticuerpo que carece de N-glicosilación en levaduras (Patente de los EE.UU. 7.927.863).

Un trabajo reciente de Baumann et al. (*BMC Genomics* 2011, 12:218), que usa el sistema GAP para producir el fragmento Fab de anticuerpo recombinante ha mostrado que este sistema, que se pensó previamente que era constitutivo, exhibe una expresión aumentada bajo condiciones hipóxicas usando glucosa como fuente de carbono y energía. Las condiciones hipóxicas son aquellas que permiten que el nivel de oxígeno disuelto en una fermentación caiga a niveles muy bajos mientras aún se provee oxígeno al cultivo mediante aireación y agitación. Esto da como resultado un metabolismo mixto aeróbico y fermentativo. El uso de condiciones hipóxicas en un fermentador puede dar como resultado la acumulación tóxica de etanol, y se debe tener cuidado en el control del proceso de manera que no se acumulen niveles tóxicos. Baumann logró esto midiendo del nivel de etanol en el fermentador y ajustando la tasa de alimentación de glucosa para reducir su acumulación. Sin embargo, este método no es muy escalable, ya que la tecnología para una medición fiable de etanol en fermentadores a gran escala no se encuentra ampliamente disponible.

Los huéspedes fúngicos tales como la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* tienen diferentes ventajas para la expresión de proteínas terapéuticas, que incluyen que no secretan grandes cantidades de proteínas endógenas, tienen promotores inducibles fuertes disponibles para la producción de proteínas heterólogas, pueden crecer en medio químico definido y sin el uso de suero animal, y pueden producir títulos altos de proteínas recombinantes (Cregg et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45-66 (2000)). El trabajo previo, que incluye el trabajo realizado por los presentes inventores, ha ayudado a establecer a *P. pastoris* como una plataforma rentable para producir anticuerpos funcionales que son adecuados para uso en investigación, diagnóstico y terapéutico. Véanse las Patentes compartidas de los EE.UU. 7.927.863 y 7.935.340. En la bibliografía también se conocen métodos para el diseño de fermentaciones de *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes, habiéndose descrito la optimización con respecto a parámetros que incluyen densidad celular, volumen del caldo de cultivo, pH, tasa de alimentación de sustrato y la longitud de cada fase de la reacción. Véase Zhang et al., "Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations" en Cregg, J. M., Ed., 2007, *Pichia Protocols* (2ª edición), *Methods in Molecular Biology*, vol. 389, Human Press, Totowa, N.J., pgs. 43-63.

Adicionalmente, el trabajo previo de los presentes solicitantes y de otros ha descrito una producción creciente de proteínas en levaduras por medio de métodos que incluyen la adición de un bolo de etanol al cultivo en o cerca del inicio de la fase de producción y con respecto a las proteínas con múltiples subunidades tales como anticuerpos, variando el número de copias de genes y la relación de número de copias entre genes de las subunidades. Véase US20130045888, titulado, Multi-Copy Strategy For High-Titer And High-Purity Production Of Multi-Subunit Proteins Such As Antibodies In Transformed Microbes Such As *Pichia Pastoris*; y US20120277408, titulado, High-Purity Production Of Multi-Subunit Proteins Such As Antibodies In Transformed Microbes Such As *Pichia Pastoris*.

A pesar de que el artículo de Zhang y et al. mencionado anteriormente hace algún esfuerzo por describir una estrategia sistemática para optimizar los parámetros mencionados anteriormente y proporciona una estrategia teórica para entender la interacción entre algunos de estos parámetros, la optimización de la expresión sigue siendo un proceso en gran medida empírico. Debido a esta interacción, generalmente es insuficiente optimizar cada parámetro individual a la vez que se mantienen los otros constantes. Por ejemplo, la composición del medio óptima puede variar con la densidad del cultivo, fondo genético de la cepa, tasa de alimentación, agitación, oxigenación, etc. Debido a esta interacción compleja, el número de combinaciones de parámetros que pueden ensayarse es potencialmente infinito e incluso si un sistema de expresión ha sido extensamente optimizado siempre queda un gran número de condiciones sin ensayar que podrían beneficiar el rendimiento y/o pureza.

Miller et al. describe "A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *saccharomyces cerevisiae*" (Proceedings of the National Academy of Sciences, 1 de octubre de 1979, 76:10, 5222-5225). Shi et al. describe "Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*" (Protein Expression and Purification, 1 de abril de 2003, 28:2, 321-330). Baumann et al. describe "Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins" (Biotechnology and Bioengineering, 1 de mayo de 2008, 100:1, 177-183). Dragosits et al. describe "The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*" (Journal of Proteome Research, 5 de marzo de 2009, 8:3, 1380-1392). WO 2013/028635 A1 describe una estrategia de múltiples copias para la producción con alta titulación y alta pureza de proteínas con múltiples subunidades tales como anticuerpos A en microbios transformados tales como *Pichia pastoris*. Potgieter et al. describe "Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*" (Journal of Biotechnology, 23 de febrero de 2009, 139:4, 318-325).

Resumen

Tal y como se describe adicionalmente más adelante, los solicitantes han identificado métodos para aumentar mucho el rendimiento de proteínas deseadas producidas en células eucariotas tales como levaduras. Incluso para los sistemas de expresión que ya han sido muy optimizados, el método objeto aumentó el rendimiento de la proteína deseada hasta aproximadamente un 30 %.

La presente invención proporciona un método para producir una proteína deseada según las reivindicaciones.

La presente descripción también proporciona un método para producir una proteína deseada, que comprende: (a) cultivar células eucariotas que comprenden uno o más genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada a una primera temperatura; y (b) cultivar dichas células eucariotas a una segunda temperatura y permitir que dichas células eucariotas produzcan dicha proteína deseada; en donde dicha segunda temperatura es diferente de dicha primera temperatura. Opcionalmente, dicho cultivo puede comprender las etapas de: (a) cultivar bajo condiciones de fermentación con alimentación discontinua una población de células de levaduras en un medio de cultivo, en donde cada célula de levadura comprende un segmento de ADN que codifica para polipéptido, en donde dicho segmento de ADN está operativamente ligado a un promotor de transcripción de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y un terminador de la transcripción, en donde la proteína no es gliceraldehído-3-fosfato, en donde la fermentación comprende un azúcar fermentable alimentado a una primera tasa de alimentación y en donde la fermentación se agita a una primera tasa de transferencia de oxígeno; (b) medir el coeficiente respiratorio (RQ) de la población durante la fermentación discontinua y determinar si está dentro de un rango predeterminado deseado, en donde el rango predeterminado deseado de RQ a aproximadamente 20 - 40 horas después del inicio del cultivo está entre aproximadamente 1,08 y aproximadamente 1,35; (c) ajustar una o ambas tasas de alimentación del azúcar fermentable a una segunda tasa de alimentación o la tasa de transferencia de oxígeno a una segunda tasa de transferencia de oxígeno, cuando el RQ está fuera de un rango predeterminado deseado; (d) repetir las etapas (b) y (c) una o más veces durante la etapa de cultivo; (e) recolectar las células de levaduras del medio de cultivo; y (f) recuperar el polipéptido de las células y/o el medio de cultivo.

Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 32 grados C.

Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 31,5 grados C.

Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 31 grados C.

- Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 30 grados C.
- Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 29,5 grados C.
- Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 29 grados C.
- Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 28,5 grados C.
- 5 Dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C.
- Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 6 grados C mayor que dicha primera temperatura.
- Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura.
- 10 Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 4 grados C mayor que dicha primera temperatura.
- Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura.
- Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 34 grados C.
- 15 Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 32 grados C.
- Dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31,5 grados C.
- Dicha segunda temperatura puede ser aproximadamente 30 grados C o aproximadamente 31 grados C.
- Dicha segunda temperatura puede ser mayor que dicha primera temperatura.
- Dicha proteína deseada comprende un complejo con múltiples subunidades.
- 20 Dicho complejo con múltiples subunidades puede comprender un anticuerpo.
- Dicho anticuerpo puede ser humano o humanizado.
- Dicho anticuerpo puede ser específico por IL-6, TNFalfa, CGRP, PCSK9, HGF o NGF.
- Dicho método puede aumentar el rendimiento de dicha proteína deseada.
- 25 Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de una o más variantes asociadas al producto en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de variantes asociadas al producto que tienen un peso molecular aparente mayor o menor que dicho complejo con múltiples subunidades deseado como se detecta por cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- 30 Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de complejos que tienen enlaces disulfuro aberrantes en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de complejos que tienen cisteínas reducidas en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- 35 Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de complejos que tienen glicosilación aberrante en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- Dicho método puede disminuir la abundancia relativa de una o más variantes asociadas al producto en relación al mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
- Dichas células eucariotas pueden comprender células de levaduras.
- Dichas células de levaduras pueden comprender levaduras metilotróficas.

Dichas levaduras metilotróficas pueden ser del género *Pichia*.

Dichas levaduras metilotróficas del género *Pichia* pueden ser *Pichia pastoris*.

Dichas levaduras metilotróficas del género *Pichia* pueden seleccionarse del grupo que consiste en: *Pichia angusta*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia metanolica* y *Pichia inositovera*.

- 5 Los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada pueden integrarse en uno o más loci genómicos.

Al menos uno de dichos loci genómicos puede seleccionarse del grupo que consiste en el locus pGAP, locus 3' AOX TT; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; y el locus HIS4 TT.

Al menos uno de los genes que codifica dichas subunidades de dicha proteína deseada puede expresarse bajo el control de un promotor inducible o constitutivo.

- 10 Dicho promotor inducible puede seleccionarse del grupo que consiste en los promotores AOX1, CUP1, inducible por tetraciclina, inducible por tiamina y FLD1.

La etapa (a) puede comprender cultivar dichas células eucariotas en un medio de cultivo que comprende glicerol como una fuente de carbono hasta que se agote dicho glicerol.

- 15 Dicha proteína deseada puede expresarse bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en: los promotores CUP1, AOX1, ICL1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), FLD1, ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5 y Pyk, promotores inducibles por tetraciclina, promotores inducibles por tiamina, promotores quiméricos derivados de los mismos, promotores de levaduras, promotores de mamíferos, promotores de insectos, promotores vegetales, promotores de reptiles, promotores de anfibios, promotores virales y promotores de aves.

Dicha célula eucariótica puede ser una célula diploide, tetraploide, o poliploide.

- 20 El método puede comprender además purificar dicha proteína deseada de dichas células eucariotas o del medio de cultivo.

Dicha proteína deseada puede purificarse de un componente intracelular, citoplasma, nucleoplasma, o una membrana de dichas células eucariotas.

Dichas células eucariotas pueden secretar dicha proteína deseada al medio de cultivo.

- 25 La etapa (a) puede comprender una fase discontinua.

Dicha fase discontinua puede comprender el cultivo de la célula eucariótica en un medio que comprende una fuente de carbono.

El final de dicha fase discontinua puede determinarse por el agotamiento de la fuente de carbono en el medio de cultivo.

La etapa (b) puede comprender una fase de alimentación discontinua.

- 30 El coeficiente respiratorio (RQ) puede mantenerse en un valor específico o en un rango específico durante la etapa (b).

Dicho valor específico de RQ puede ser aproximadamente 1,12.

Dicho rango específico de RQ puede ser aproximadamente 1,0 a 1,24, o aproximadamente 1,06 a 1,18, o aproximadamente 1,09 a 1,15.

- 35 Dicho valor de RQ o dicho rango de RQ puede ser mantenido por la modulación de uno o más de la tasa de alimentación, composición de la alimentación, tasa de flujo de aire suministrado, tasa de agitación, y/o concentración de oxígeno del aire suministrado.

El método puede comprender una fase discontinua y una fase de alimentación discontinua.

- 40 La fase discontinua puede comprender cultivar las células eucariotas con una fuente de carbono hasta que se agote dicha fuente de carbono. Dicha fuente de carbono puede comprender uno o más de: glicerol, glucosa, etanol, citrato, sorbitol, xilosa, trehalosa, arabinosa, galactosa, fructosa, melibiosa, lactosa, maltosa, ramnosa, ribosa, manosa, manitol y rafinosa y preferentemente comprende glicerol.

La fase de alimentación discontinua puede iniciarse después de la fase discontinua.

El cambio de temperatura puede ser realizado a o cerca del final de la fase discontinua, a o cerca del inicio de la fase de alimentación discontinua, entre la fase discontinua y la fase de alimentación discontinua.

Por ejemplo, el cambio de temperatura puede realizarse antes del agotamiento de la fuente de carbono, o antes de comenzar la adición de la alimentación, o después de comenzar la adición de la alimentación.

5 Preferentemente, el cambio de temperatura se realiza menos de 5 horas después de comenzar la adición de la alimentación, por ejemplo, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, o menos de 5 minutos después de comenzar la adición de la alimentación. Sin embargo, el cambio de temperatura puede realizarse antes o más tarde en el tiempo.

10 El método puede incluir la adición de un bolo de etanol al cultivo. El bolo de etanol puede añadirse concurrentemente con el agotamiento de la fuente de carbono añadida al cultivo inicial, que puede detectarse por un aumento rápido en la concentración de oxígeno disuelto (pico de oxígeno disuelto) o por otros medios.

El bolo de etanol puede dar como resultado una concentración de etanol en el cultivo de entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,02 % y aproximadamente el 3,75 %, entre aproximadamente el 0,04 % y aproximadamente el 3,5 %, entre aproximadamente el 0,08 % y aproximadamente el 3,25 %, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 0,2 % y aproximadamente el 2,75 %, entre aproximadamente el 0,3 % y aproximadamente el 2,5 %, entre aproximadamente el 0,4 % y aproximadamente el 2,25 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 1,5 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 2 %, entre aproximadamente el 0,6 % y aproximadamente el 1,75 %, entre aproximadamente el 0,7 % y aproximadamente el 1,5 %, o entre aproximadamente el 0,8 % y aproximadamente el 1,25 %.

El bolo de etanol puede dar como resultado una concentración de etanol en el cultivo que puede ser de menos aproximadamente el 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,10 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 % o 0,9 % (p/v).

25 El bolo de etanol puede dar como resultado una concentración de etanol en el cultivo que puede ser como máximo aproximadamente el 4 %, 3,5 %, 3 %, 2,5 %, 2 %, 1,8 %, 1,6 %, 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,35 %, 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, o 0,15 % (p/v).

30 La etapa de añadir el bolo de etanol puede comprender añadir etanol a dicho cultivo, añadir un vehículo que comprende etanol a dicho cultivo, añadir dichas a un medio o vehículo que comprende etanol, o reemplazar parte del medio de cultivo.

Dicha proteína deseada puede contener uno o más polipéptidos que comprenden al menos un enlace disulfuro.

Dicha proteína deseada puede comprender un complejo con múltiples subunidades.

Dicho complejo con múltiples subunidades puede comprender un anticuerpo.

35 El método puede disminuir la abundancia relativa de una o más variantes asociadas al producto en relación al mismo método realizado en ausencia del cambio de temperatura.

El método puede disminuir la abundancia relativa de variantes asociadas al producto que tiene un peso molecular aparente mayor o menor que dicho complejo con múltiples subunidades deseado como se detecta por cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel en relación al mismo método realizado en ausencia del cambio de temperatura.

40 El método puede disminuir la abundancia relativa de complejos que tienen estequiometría aberrante en relación al mismo método realizado en ausencia del cambio de temperatura.

El método puede disminuir la abundancia relativa de complejos que tienen enlaces disulfuro aberrantes en relación al mismo método realizado en ausencia del cambio de temperatura.

El método puede comprender añadir una alimentación a las células eucariotas.

45 El valor del coeficiente respiratorio (RQ) puede mantenerse en un valor específico o en un rango específico. Dicho valor específico de RQ puede ser 1,12. Dicho rango específico de RQ puede ser, por ejemplo, 1,0 a 1,24, o 1,06 a 1,18, o 1,09 a 1,15.

- El valor o rango específico de RQ puede mantenerse por la modulación (aumento o disminución) de una o más de concentración de glucosa, disponibilidad de oxígeno, intensidad de la agitación, presión de gas, tasa de flujo del aire suministrado u otra mezcla de gases, viscosidad del cultivo, densidad del cultivo, concentración de oxígeno en el aire suministrado u otra mezcla de gases y temperatura. Por ejemplo, la tasa de adición de la alimentación (tasa de alimentación) puede modularse (aumento o disminución) con el objetivo de controlar el coeficiente respiratorio (RQ), por ejemplo, para mantener un valor o rango específico de RQ.
- 5 Dicha alimentación puede comprender al menos una fuente de carbono fermentable.
- Dicha fuente de carbono puede comprender uno o más de: glicerol, glucosa, etanol, citrato, sorbitol, xilosa, trehalosa, arabinosa, galactosa, fructosa, melibiosa, lactosa, maltosa, ramnosa, ribosa, manosa, manitol y rafinosa.
- 10 Los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada pueden integrarse en uno o más loci genómicos.
- Al menos uno de dichos loci genómicos puede seleccionarse del grupo que consiste en el locus pGAP, el locus 3' AOX TT; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; y el locus HIS4 TT.
- Al menos uno de los genes que codifican dichas subunidades del complejo con múltiples subunidades puede expresarse bajo el control de un promotor inducible o constitutivo.
- 15 Dicho promotor inducible puede seleccionarse del grupo que consiste en los promotores AOX1, CUP1, el promotor inducible de la tetraciclina, el promotor inducible de la tiamina y FLD1.
- Al menos uno de los genes que codifican dichas subunidades del complejo con múltiples subunidades puede expresarse bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en: los promotores de CUP1, AOX1, ICL1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), FLD1, ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5 y Pyk, promotores inducibles por tetraciclina, promotores inducibles por tiamina, promotores quiméricos derivados de éstos, promotores de levaduras, promotores de mamíferos, promotores de insectos, promotores de plantas, promotores de reptiles, promotores de anfibios, promotores virales y promotores de aves.
- 20 Dicha célula eucariota puede ser una célula diploide, tetraploide o poliploide.
- El método también puede comprender purificar dicho complejo con múltiples subunidades a partir de dichas células eucariotas o a partir del medio de cultivo.
- 25 Dicho complejo con múltiples subunidades puede purificarse a partir de un componente intracelular, citoplasma, nucleoplasma o una membrana de dichas células eucariotas.
- Dichas células eucariotas secretan dicha proteína deseada en el medio de cultivo.
- Dicha proteína deseada puede purificarse a partir de dicho medio de cultivo.
- 30 Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo mono específico o biespecífico.
- Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo humano, o un anticuerpo humanizado o un fragmento de éstos.
- Dicho anticuerpo humanizado puede provenir de un ratón, rata, conejo, cabra, oveja o vaca.
- Dicho anticuerpo humanizado puede provenir de un conejo.
- 35 Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo monovalente, bivalente o multivalente.
- Dicho anticuerpo puede purificarse a partir de dicho cultivo por afinidad por la proteína A y/o por la proteína G.
- Al menos uno de los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada puede optimizarse para expresarlo en dicha célula eucariótica.
- 40 Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo, y la pureza de dicho anticuerpo puede evaluarse midiendo la fracción del anticuerpo que se produce por dicha célula eucariota que puede estar contenida en complejos de anticuerpos que tienen el radio hidrodinámico aparente esperado, que puede estar contenida en complejos de anticuerpos que tienen el peso molecular esperado y/o que se une específicamente a una diana de dicho anticuerpo.
- Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo, y el rendimiento de dicho anticuerpo puede evaluarse determinando la cantidad del anticuerpo producida por dicha célula eucariota, exceptuando las variantes anormalmente

glucosiladas asociadas al producto, contenidas en complejos de anticuerpos distintos de los complejos que tienen el radio hidrodinámico aparente esperado, contenidas en complejos de anticuerpos que tienen el peso molecular esperado y/o que no se unen específicamente a la diana de dicho anticuerpo.

El peso molecular de dichos complejos de anticuerpos puede determinarse por medio de SDS-PAGE no reductora.

- 5 Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo, y dicho método también puede comprender purificar dicho anticuerpo.

Dicha célula cultivada puede producir una titulación de anticuerpos en el sobrenadante de al menos 100 mg/l, de al menos 150 mg/l, de al menos 200 mg/l, de al menos 250 mg/l, de al menos 300 mg/l, de entre 100 y 300 mg/l, de entre 100 y

- 10 500 mg/l, de entre 100 y 1.000 mg/l, de al menos 1.000 mg/l, de al menos 1.250 mg/litro, de al menos 1.500 mg/litro, de al menos aproximadamente 1.750 mg/litro, de al menos aproximadamente 2.000 mg/litro, de al menos aproximadamente 10.000 mg/litro o más.

Dicha proteína deseada puede comprender un complejo con múltiples subunidades y una o más subunidades de dicho complejo con múltiples subunidades pueden expresarse a partir de más una copia de un gen.

- 15 Dicha proteína deseada puede comprender un anticuerpo, el cual puede expresarse a partir de 1-10 copias de un gen que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo y a partir de 1-10 copias de un gen que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo.

El o los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada pueden estar integrados en el genoma de dichas células.

- 20 El o los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada pueden estar contenidos en un elemento extracromosómico, en un plásmido o en un cromosoma artificial.

Dichas células pueden comprender más copias del gen que proporciona la expresión de la cadena ligera de dicho anticuerpo que del gen que proporciona la expresión de la cadena pesada de dicho anticuerpo.

- 25 El número respectivo de copias del gen que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y el número de copias del gen que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo en dichas células puede ser: 2 y 2, 2 y 3, 3 y 3, 3 y 4, 3 y 5, 4 y 3, 4 y 4, 4 y 5, 4 y 6, 5 y 4, 5 y 5, 5 y 6 o 5 y 7.

El número respectivo de copias del gen que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo y el número respectivo de copias del gen que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo en dichas células puede ser: 2 y 1, 3 y 1, 4 y 1, 5 y 1, 6 y 1, 7 y 1, 8 y 1, 9 y 1, 10 y 1, 1 y 2, 2 y 2, 3 y 2, 4 y 2, 5 y 2, 6 y 2, 7 y 2, 8 y 2, 9 y 2, 10 y 2, 1 y 3, 2 y 3, 3 y 3, 4 y 3, 5 y 3, 6 y 3, 7 y 3, 8 y 3, 9 y 3, 10 y 3, 1 y 4, 2 y 4, 3 y 4, 4 y 4, 5 y 4, 6 y 4, 7 y 4, 8 y 4, 9 y 4, 10 y 4, 1 y 5, 2 y 5, 3 y 5, 4 y 5, 5 y 5, 6 y 5, 7 y 5, 8 y 5, 9 y 5, 10 y 5, 1 y 6, 2 y 6, 3 y 6, 4 y 6, 5 y 6, 6 y 6, 7 y 6, 8 y 6, 9 y 6, 10 y 6, 1 y 7, 2 y 7, 3 y 7, 4 y 7, 5 y 7, 6 y 7, 7 y 7, 8 y 7, 9 y 7, 10 y 7, 1 y 8, 2 y 8, 3 y 8, 4 y 8, 5 y 8, 6 y 8, 7 y 8, 8 y 8, 9 y 8, 10 y 8, 1 y 9, 2 y 9, 3 y 9, 4 y 9, 5 y 9, 6 y 9, 7 y 9, 8 y 9, 9 y 9, 10 y 9, 1 y 10, 2 y 10, 3 y 10, 4 y 10, 5 y 10, 6 y 10, 7 y 10, 8 y 10, 9 y 10 o 10 y 10.

- 35 Usando los métodos de la presente descripción, la abundancia relativa de producto(s) secundario(s) no deseado(s) puede disminuirse en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o hasta niveles no detectables en comparación con los niveles de abundancia iniciales, en relación a métodos convencionales. Los productos secundarios no deseados ejemplares cuya

- 40 abundancia relativa puede disminuirse tanto pueden incluir una o más especies que tienen un peso molecular aparente diferente del complejo con múltiples subunidades deseado. Por ejemplo, el peso molecular aparente puede afectarse por diferencias en la estequiometría, plegamiento, ensamblaje del complejo, y/o glicosilación. Por ejemplo, dichos productos secundarios no deseados pueden detectarse usando cromatografía de exclusión por tamaño y/o electroforesis en gel y pueden tener un peso molecular aparente mayor o menor que el complejo con múltiples subunidades deseado. En algunos ejemplos, los productos secundarios no deseados pueden detectarse bajo condiciones reductoras. En otros

- 45 ejemplos, los productos secundarios no deseados pueden detectarse bajo condiciones no reductoras.

En algunos ejemplos, la presente descripción también proporciona métodos y composiciones de materia mejorados que proporcionan la producción recombinante de anticuerpos y otros complejos con múltiples subunidades, con un mayor rendimiento. En algunos ejemplos, el rendimiento puede aumentarse en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 100 %, o más (en relación a métodos convencionales) usando los métodos descritos en la presente memoria.

- 50

- 5 En algunos ejemplos, la célula eucariótica en la cual puede producirse la proteína deseada puede ser una levadura, por ejemplo, en una especie de *Pichia* tal como *P. pastoris* u otras levaduras metilotróficas, o en una especie de *Saccharomyces* tal como *S. cerevisiae*, u otra levadura tal como *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *S. pombe*). Otros ejemplos de levaduras metilotróficas que pueden utilizarse incluyen *Pichia angusta* (también conocida en la técnica como *Hansenula polymorpha*), *Pichia guilliermondii*, *Pichia methanolica*, *Pichia inositovera*, *Ogataea nitratovera* y *Candida boidinii*.
- 10 La célula eucariótica puede ser una célula de levadura, tal como una levadura metilotrófica, tal como una levadura del género *Pichia*. Las levaduras metilotróficas ejemplares del género *Pichia* incluyen *Pichia pastoris*, *Pichia angusta*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia methanolica* y *Pichia inositovera*. La célula huésped puede producirse por cruzamiento, por ejemplo, por cruzamiento de dos células haploides de levadura que cada una contenga una o más copias de al menos un gen que codifica una subunidad del complejo con múltiples subunidades.
- Según la invención, la célula eucariota es *Pichia pastoris*. La célula eucariótica puede ser una célula haploide, diploide o tetraploide.
- 15 Al menos uno de los genes que codifican dicha proteína deseada puede expresarse bajo el control de un promotor inducible o constitutivo, tal como CUP1 (inducido por el nivel de cobre en el medio; véase Koller et al., *Yeast* 2000; 16: 651-656.), promotores inducibles por tetraciclina (véase, por ejemplo, Staib et al., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, enero de 2008, p. 146-156), promotores inducibles por tiamina, promotores de AOX1, ICL1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), FLD1, ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5 y Pyk, promotores quiméricos derivados de los mismos, promotores de levaduras, promotores de mamíferos, promotores de insectos, promotores vegetales, promotores de reptiles, promotores de anfibios, promotores virales y promotores de aves.
- 20 La célula eucariótica puede secretar dicha proteína deseada en el medio de cultivo. Por ejemplo, dicha proteína deseada puede comprender un péptido señal de secreción. Como alternativa o adicionalmente, dicho complejo con múltiples subunidades deseado puede ser retenido en dicha célula huésped y puede aislarse de la misma.
- 25 La proteína deseada puede comprender un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoespecífico o biespecífico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une específicamente a cualquier antígeno.
- La proteína deseada puede comprender un anticuerpo de cualquier tipo. Los tipos de anticuerpo ejemplares incluyen anticuerpos de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, humano, ratón, rata, conejo, cabra, oveja, vaca, etc. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado que puede ser de conejo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monovalente, bivalente o multivalente.
- 30 Al menos uno de dichos genes que proporcionan la expresión de la proteína deseada, tal como la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo deseado, en dicha célula eucariótica puede ser optimizado para la expresión en dicha célula huésped (por ejemplo, por selección de codones preferidos y/o alterando el porcentaje de AT por selección de codones).
- 35 La pureza de dicha proteína deseada, tal como un anticuerpo deseado, puede evaluarse por medida de la fracción de la proteína deseada producida por dicha célula huésped que no está glicosilada, está contenida en complejos que tienen el radio hidrodinámico aparente esperado y/o peso molecular aparente (por ejemplo, medido por cromatografía de exclusión por tamaño), tiene la movilidad electroforética esperada (por ejemplo, detectada por electroforesis en gel, tal como SDS-PAGE y opcionalmente transferencia Western) y/o por medida de la actividad específica del complejo con múltiples subunidades (por ejemplo, unión específica a una diana de un anticuerpo deseado).
- 40 La proteína deseada puede ser un anticuerpo y el rendimiento de dicho anticuerpo puede evaluarse por determinación de la cantidad de anticuerpo deseado producido por dicha célula huésped descontando cualquier variante asociada al producto que está glicosilada, contenida en complejos de anticuerpo diferentes de los complejos que tienen el peso molecular aparente esperado o radio hidrodinámico y/o que no se unen específicamente a la diana de dicho anticuerpo deseado.
- 45 Según otro ejemplo de la descripción, se proporciona un método que produce una proteína deseada tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo en células de levaduras. Una población de células de levaduras se cultiva bajo condiciones de fermentación con alimentación discontinua en un medio de cultivo. Cada célula de levadura comprende un segmento de ADN que codifica una proteína deseada, tal como un polipéptido de la cadena pesada y opcionalmente un segmento de ADN que codifica una segunda proteína deseada, tal como un polipéptido de cadena ligera de un anticuerpo. El uno o más segmentos de ADN están operativamente ligados al promotor de transcripción del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y un terminador de la transcripción. La fermentación comprende la alimentación de un azúcar fermentable a una primera tasa de alimentación y la fermentación se oxigena a una primera
- 50

tasa de transferencia de oxígeno. El coeficiente respiratorio (RQ) de la población se mide durante la fase de alimentación de la fermentación con alimentación discontinua y se compara con un rango predeterminado deseado. Uno o ambos de la tasa de alimentación del azúcar fermentable y la tasa de transferencia de oxígeno se ajustan a una segunda tasa cuando el RQ está fuera de un rango predeterminado deseado. La medida y ajuste se realizan durante todo o parte del cultivo. Las células de levaduras se recolectan del medio de cultivo. Las proteínas deseadas, tal como los polipéptidos de la cadena pesada y cadena ligera producidos por las células de levaduras, se recuperan del medio de cultivo agotado de las células de levadura o de las células de levaduras.

Según otro ejemplo de la descripción, se proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras en células de levadura *Pichia*. Una población de células de levadura *Pichia* se cultiva bajo condiciones hipóxicas de fermentación con alimentación discontinua en un medio de cultivo. Cada célula de levadura comprende un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la cadena pesada y un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la cadena ligera de un anticuerpo. Los segmentos de ADN están operativamente ligados a un promotor de transcripción del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y un terminador de la transcripción. Las células de levaduras se recolectan del medio de cultivo. El anticuerpo producido por las células de levaduras se recupera de las células de levaduras o del medio de cultivo agotado de las células de levadura.

La presente descripción también proporciona un mecanismo de control por retroalimentación para una fermentación de células de levaduras para producir proteínas deseadas que usa una medida del coeficiente respiratorio el cual ajusta los niveles de oxigenación y/o alimentación del azúcar fermentable. El mecanismo de control por retroalimentación permite cultivos bien controlados que producen buenas cantidades de producto a la vez que evitan la acumulación tóxica de etanol. Adicionalmente, las proteínas deseadas producidas de esta forma tienen propiedades de calidad excelentes, tal como excelente homogeneidad y apropiado ensamblaje entre las subunidades. Por ejemplo, la descripción proporciona un método para producir una proteína deseada, en células de levaduras, que comprende las etapas de: (a) cultivar bajo condiciones de fermentación con alimentación discontinua una población de células de levaduras en un medio de cultivo, en donde cada célula de levadura comprende un segmento de ADN que codifica un polipéptido, en donde dicho segmento de ADN está operativamente ligado a un promotor de transcripción del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y un terminador de la transcripción, en donde la proteína no es gliceraldehído-3-fosfato, en donde la fermentación comprende una alimentación de un azúcar fermentable a una primera tasa de alimentación y en donde la fermentación se agita a una primera tasa de transferencia de oxígeno; (b) medir el coeficiente respiratorio (RQ) de la población durante la fermentación discontinua y determinar si está dentro de un rango predeterminado deseado, en donde el rango predeterminado deseado de RQ a aproximadamente 20-40 horas después del inicio del cultivo está entre aproximadamente 1,08 y aproximadamente 1,35; (c) ajustar uno o ambos de la tasa de alimentación de azúcar fermentable a una segunda tasa de alimentación o la tasa de transferencia de oxígeno a una segunda tasa de transferencia de oxígeno, cuando el RQ está fuera de un rango predeterminado deseado; (d) repetir las etapas (b) y (c) una o más veces durante la etapa de cultivo; (e) recolectar las células de levaduras del medio de cultivo; y (f) recuperar el polipéptido de las células y/o del medio de cultivo. Opcionalmente, dicho método puede incluir (a) cultivar células eucariotas que comprenden uno o más genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada a una primera temperatura; y (b) cultivar dichas células eucariotas a una segunda temperatura y permitir que dichas células eucariotas produzcan dicha proteína deseada; en donde dicha segunda temperatura puede ser diferente de dicha primera temperatura; por ejemplo, dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 32 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 31,5 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 31 grados C, entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 30 grados C, entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 29,5 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 29 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 28,5 grados C, o entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 6 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 4 grados C mayor que dicha primera temperatura, o entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 34 grados C, entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 32 grados C, o entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31,5 grados C; tal como dicha primera temperatura puede ser aproximadamente 28 grados C y dicha segunda temperatura puede ser aproximadamente 30 grados C o aproximadamente 31 grados C; o dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C y dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31 grados C; en donde, opcionalmente, dicha primera temperatura es mayor que dicha segunda temperatura.

Dicha etapa (d) puede realizarse a intervalos de entre aproximadamente 1 y 5 minutos, tal como a intervalos de aproximadamente 3 minutos.

Dicha etapa (d) puede realizarse continuamente.

En la etapa (c) puede hacerse al menos un ajuste en la tasa de alimentación.

La etapa (c) puede realizarse automáticamente usando un mecanismo de control por retroalimentación vinculado a un dispositivo que mide el RQ.

5 Las células de levaduras pueden ser de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Pichia thermomethanolica* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El método puede comprender además administrar etanol a las células de levaduras a aproximadamente 10-14 horas del cultivo para lograr un nivel en la fermentación de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,0 g/l de etanol.

El rango predeterminado deseado de RQ a aproximadamente las 20-40 horas después del inicio del cultivo puede ser entre aproximadamente 1,09 y aproximadamente 1,25.

10 La etapa de recolección puede realizarse a aproximadamente las 80-110 horas después del inicio del cultivo.

La concentración de etanol puede medirse durante la etapa de cultivo y pueden hacerse ajustes para estabilizar la concentración de etanol por encima de aproximadamente 5 g/l y por debajo de aproximadamente 25 g/l, en donde dichos ajustes pueden hacerse por ajuste de uno o ambos de la tasa de alimentación de azúcar fermentable a una tercera tasa de alimentación o la tasa de transferencia de oxígeno a una tercera tasa de transferencia de oxígeno. Por ejemplo, 15 dichos ajustes pueden hacerse para estabilizar la concentración de etanol por encima de aproximadamente 5 g/l y por debajo de aproximadamente 17 g/l.

El rango predeterminado deseado de RQ a las 20-110 horas de la fermentación puede seleccionarse del grupo que consiste en: aproximadamente 1,08-1,1; aproximadamente 1,08-1,15; aproximadamente 1,08-1,2; aproximadamente 1,08-1,25; aproximadamente 1,08-1,3; y aproximadamente 1,08-1,35.

20 La etapa (b) de medida puede realizarse por muestreo de los gases de salida de la fermentación.

La etapa (b) de medida puede realizarse usando un espectrómetro de masas, analizador infrarrojo, o analizador paramagnético.

25 En la etapa (c), la tasa de transferencia de oxígeno puede ajustarse, bien por aumento de la tasa de transferencia de oxígeno cuando el RQ pueda estar demasiado alto o por disminución de la tasa de transferencia de oxígeno cuando el RQ pueda estar demasiado bajo.

En la etapa (c), la tasa de alimentación de azúcar fermentable puede ajustarse, bien por aumento de la tasa de alimentación de azúcar fermentable cuando el RQ pueda estar demasiado bajo o por disminución de la tasa de alimentación de azúcar fermentable cuando el RQ pueda estar demasiado alto.

30 En la etapa (c), la tasa de alimentación de azúcar fermentable también puede ajustarse, bien por aumento de la tasa de alimentación de azúcar fermentable cuando el RQ pueda estar demasiado bajo y por disminución de la tasa de alimentación de azúcar fermentable cuando el RQ pueda estar demasiado alto.

La etapa (c) puede realizarse por modulación de la tasa de agitación del cultivo.

El segmento de ADN puede codificar una cadena pesada de anticuerpo o una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo.

35 El polipéptido puede recolectarse del medio de cultivo.

Cada célula de levadura puede comprender un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la cadena pesada y un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la cadena ligera de un anticuerpo.

40 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras o un fragmento de anticuerpo en células de levaduras *Pichia*, que comprende las etapas de: (a) cultivar bajo condiciones hipóxicas de fermentación con alimentación discontinua una población de células de levaduras *Pichia* en un medio de cultivo, en donde cada célula de levadura comprende un segmento de ADN que codifica un polipéptido de cadena pesada y un segmento de ADN que codifica un polipéptido de cadena ligera de un anticuerpo, en donde dichos segmentos de ADN pueden estar operativamente ligados a un promotor de transcripción del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y un terminador de la transcripción; (b) recolectar las células de levaduras del medio de cultivo; y (c) recuperar el anticuerpo producido por las células de levaduras del medio de cultivo agotado de las células de levadura. Opcionalmente, dicho método puede incluir (a) cultivar células eucariotas que comprenden uno o más genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada a una primera temperatura; y (b) cultivar dichas células 45

5 eucariotas a una segunda temperatura y permitir que dichas células eucariotas produzcan dicha proteína deseada; en donde dicha segunda temperatura puede ser diferente de dicha primera temperatura; por ejemplo, dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 32 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 31,5 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 31 grados C, entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 30 grados C, entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 29,5 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 29 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 28,5 grados C, o entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 6 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 4 grados C mayor que dicha primera temperatura, o entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 34 grados C, entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 32 grados C, o entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31,5 grados C; tal como dicha primera temperatura puede ser aproximadamente 28 grados C y dicha segunda temperatura puede ser aproximadamente 30 grados C o aproximadamente 31 grados C; o dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C y dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31 grados C; en donde, opcionalmente, dicha primera temperatura es mayor que dicha segunda temperatura.

20 Las células de levadura *Pichia* pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta* y *Pichia thermomethanolica*. Por ejemplo, las células de levadura *Pichia* pueden ser *Pichia pastoris*.

En otro ejemplo, la descripción proporciona un proceso de fermentación a gran escala que comprende las etapas de: (i) cultivar las células de levaduras en condiciones de fermentación con alimentación discontinua a gran escala, en donde dichas células de levaduras cultivadas pueden prepararse por ingeniería para expresar una proteína deseada; (ii) monitorizar periódica o continuamente los valores de RQ durante la fermentación con alimentación discontinua; y determinar si el valor de RQ cae dentro de un rango específico; (iii) ajustar al menos un parámetro del cultivo al menos una vez durante la fermentación con alimentación discontinua para ajustar o mantener el valor de RQ del cultivo de levaduras con alimentación discontinua de forma que pueda estar dentro del rango específico; y (iv) recolectar las células de levaduras o el medio de cultivo y recuperar la proteína deseada de las células recolectadas o del medio de cultivo de la etapa (iii). Opcionalmente, dicho método puede incluir (a) cultivar células eucariotas que comprenden uno o más genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada a una primera temperatura; y (b) cultivar dichas células eucariotas a una segunda temperatura y permitir que dichas células eucariotas produzcan dicha proteína deseada; en donde dicha segunda temperatura puede ser diferente de dicha primera temperatura; por ejemplo, dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 32 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 31,5 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 31 grados C, entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 30 grados C, entre aproximadamente 20 grados C y aproximadamente 29,5 grados C, entre aproximadamente 24 grados C y aproximadamente 29 grados C, entre aproximadamente 27 grados C y aproximadamente 28,5 grados C, o entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 6 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 1 grado C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura, entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 4 grados C mayor que dicha primera temperatura, o entre aproximadamente 2 grados C y aproximadamente 3 grados C mayor que dicha primera temperatura; y/u opcionalmente, dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 34 grados C, entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 32 grados C, o entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31,5 grados C; tal como dicha primera temperatura puede ser aproximadamente 28 grados C y dicha segunda temperatura puede ser aproximadamente 30 grados C o aproximadamente 31 grados C; o dicha primera temperatura puede ser entre aproximadamente 27,5 grados C y aproximadamente 28,5 grados C y dicha segunda temperatura puede ser entre aproximadamente 30 grados C y aproximadamente 31 grados C; en donde, opcionalmente, dicha primera temperatura es mayor que dicha segunda temperatura.

La proteína puede ser una proteína de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

La proteína (por ejemplo, proteína de anticuerpo o fragmento de anticuerpo) puede ser secretada por la levadura.

Los parámetros de cultivo ajustados pueden incluir uno o más de (a) tasa de flujo de aire, (b) concentración de oxígeno, (c) composición de la alimentación, (d) tasa de alimentación, (e) densidad celular y (f) agitación.

55 El parámetro de cultivo ajustado puede comprender uno o más de (a) la composición de alimentación, (b) la tasa de alimentación y (c) la tasa de transferencia de oxígeno; y en donde el parámetro del cultivo puede ajustarse al menos una

vez durante el proceso de forma tal de ajustar o mantener el valor de RQ del cultivo de levaduras de alimentación discontinua tal que pueda estar dentro del rango específico.

El método puede incluir además una fermentación discontinua que precede al cultivo de fermentación con alimentación discontinua.

- 5 La fermentación con alimentación discontinua puede realizarse durante al menos 50 horas, o durante al menos 70 horas.
Las células de levaduras pueden ser *Pichia pastoris*, tal como *Pichia pastoris* poliploide, haploide o diploide.
La densidad celular del cultivo con alimentación discontinua puede comprender de 1 a 700 g/l de peso celular húmedo.
En la etapa (iii) la tasa de alimentación puede aumentarse o disminuirse de forma que se ajuste el valor de RQ para que se encuentre dentro del rango especificado.
- 10 En la etapa (iii), la composición de alimentación puede alterarse por alteración de la cantidad de al menos un azúcar fermentable u otro hidrocarburo de forma que se ajuste el valor de RQ para que se encuentre dentro del rango especificado.
En la etapa (iii), la cantidad de oxígeno en la fermentación con alimentación discontinua puede aumentarse o disminuirse durante la fermentación con alimentación discontinua de forma que se ajuste el valor de RQ para que se encuentre dentro del rango especificado.
- 15 En la etapa (iii), en donde la cantidad de al menos un azúcar fermentable u otro hidrocarburo fermentable puede aumentarse o disminuirse de forma que se ajuste el valor de RQ para que se encuentre dentro del rango especificado.
En la etapa (iii), la tasa de alimentación puede aumentarse o disminuirse durante la fermentación con alimentación discontinua de forma que se ajuste el valor de RQ para que se encuentre dentro del rango especificado.
- 20 El proceso puede dar lugar a una mejora en una propiedad seleccionada de pureza del anticuerpo y producción del anticuerpo en relación con un proceso de alimentación discontinua que no incluye la etapa (iii).
El rango especificado para el valor de RQ en la etapa (iii) puede ser entre aproximadamente 1,08-1,35, o entre aproximadamente 1,08-1,2.
- 25 Estos y otros ejemplos que resultarán evidentes para los expertos en la técnica después de leer la memoria descriptiva, proporcionan a la técnica métodos y productos con fiabilidad, predictibilidad, eficacia y calidad mejoradas.

Descripción breve de los dibujos

- Fig. 1: muestra los perfiles de RQ de 3 cepas de Mab1 diferentes A, B y C. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.
- 30 Fig. 2: muestra los perfiles de agitación de 3 cepas de Mab1 diferentes A, B y C. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.
- Fig. 3: muestra los perfiles de etanol de 3 cepas de Mab1 diferentes A, B y C.
- Fig. 4: muestra los perfiles de crecimiento de 3 cepas de Mab1 diferentes A, B y C.
- Fig. 5: muestra los perfiles de titulación de caldo de cultivo completo de 3 cepas de Mab1 diferentes A, B y C.
- 35 Fig. 6: muestra los perfiles de RQ de la cepa de Mab1 A a 3 valores ajustados de RQ diferentes RQ 1,09-1,15, 1,19-1,25, 1,29-1,35. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.
- Fig. 7: muestra los perfiles de agitación de la cepa de Mab1 A a 3 valores ajustados de RQ diferentes RQ 1,09-1,15, 1,19-1,25, 1,29-1,35. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.
- Fig. 8: muestra los perfiles de etanol de la cepa de Mab1 A a 3 valores ajustados de RQ diferentes RQ 1,09-1,15, 1,19-1,25, 1,29-1,35.
- 40 Fig. 9: muestra los perfiles de crecimiento de la cepa de Mab1 A a 3 valores ajustados de RQ diferentes RQ 1,09-1,15, entre 1,19-1,25, entre 1,29-1,35.
- Fig. 10: muestra los perfiles de titulación en caldo de cultivo completo de la cepa de Mab1 A a 3 valores ajustados de RQ

diferentes RQ 1,09-1,15, 1,19-1,25, 1,29-1,35.

Fig. 11: muestra los perfiles de RQ de la cepa de Mab1 A crecida bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

5 Fig. 12: muestra los perfiles de agitación de la cepa de Mab1 A crecida bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 13: muestra los perfiles de etanol de la cepa de Mab1 A crecida bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas.

Fig. 14: muestra los perfiles de crecimiento de la cepa de Mab1 A crecida bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas.

Fig. 15: muestra los perfiles de %DO de la cepa de Mab1 A crecida crecer bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas.

10 Fig. 16: muestra los perfiles de titulación en caldo de cultivo completo de la cepa de Mab1 A crecida bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas.

Fig. 17: muestra los perfiles de RQ de 4 cepas de Mab2 diferentes A, B, C y D. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 18: muestra los perfiles de agitación de 4 cepas de Mab2 diferentes A, B, C y D. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

15 Fig. 19: muestra los perfiles de etanol de 4 cepas de Mab2 diferentes A, B, C y D.

Fig. 20: muestra los perfiles de crecimiento de 4 cepas de Mab2 diferentes A, B, C y D.

Fig. 21: muestra los perfiles de titulación en caldo de cultivo completo de 4 cepas diferentes A, B, C y D.

Fig. 22: muestra los perfiles de RQ de 3 cepas de Mab3 diferentes A, B y C. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

20 Fig. 23: muestra los perfiles de agitación de 3 cepas de Mab3 diferentes A, B y C. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 24: muestra los perfiles de etanol de 3 cepas de Mab3 diferentes A, B y C.

Fig. 25: muestra los perfiles de crecimiento de 3 cepas de Mab3 diferentes A, B y C.

Fig. 26: muestra los perfiles de titulación en caldo de cultivo completo de 3 cepas de Mab3 diferentes A, B y C.

25 Fig. 27: muestra los perfiles de RQ de la cepa de Mab3 B a diferentes tasas de alimentación. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 28: muestra los perfiles de agitación de la cepa de Mab3 B a diferentes tasas de alimentación. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 29: muestra los perfiles de etanol de la cepa de Mab3 B a diferentes tasas de alimentación.

30 Fig. 30: muestra los perfiles de crecimiento de la cepa de Mab3 B a diferentes tasas de alimentación.

Fig. 31: muestra los perfiles de titulación en caldo de cultivo completo de la cepa de Mab3 B a diferentes tasas de alimentación.

Fig. 32: muestra los perfiles de RQ de la cepa de Mab4 A a diferentes tasas de alimentación. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

35 Fig. 33: muestra los perfiles de agitación de la cepa de Mab4 A a diferentes tasas de alimentación. La línea vertical indica el tiempo al cual se inició el control de RQ.

Fig. 34: muestra los perfiles de etanol de la cepa de Mab4 A a diferentes tasas de alimentación.

Fig. 35: muestra los perfiles de crecimiento de la cepa de Mab4 A a diferentes tasas de alimentación.

Fig. 36: muestra los perfiles de caldo de cultivo completo de la cepa de Mab4 A a diferentes tasas de alimentación.

Fig. 37: muestra los perfiles de caldo de cultivo completo de la cepa de Mab2 A para el proceso aeróbico (B1) e hipóxico (B2) en fermentación a gran escala.

Fig. 38: muestra los geles de SDS-PAGE no reductores y reductores de la cepa de Mab1 A a los tiempos de fermentación 62, 70 y 86 horas para condiciones de proceso aeróbico e hipóxico.

5 Fig. 39: muestra los geles de SDS-PAGE no reductores y reductores de la cepa de Mab1 A a los tiempos de fermentación 62, 69 y 85 horas.

La Fig. 40 ilustra el efecto beneficioso de un cambio en la temperatura del cultivo en la producción de anticuerpo recombinante. Se representa la titulación de anticuerpo (unidades arbitrarias) en caldo de cultivo completo ("WB") frente a los puntos de tiempo durante la fermentación para cinco cambios de temperatura diferentes y un control sin cambio (mantenido a 28° C). La temperatura previa al cambio fue 28° C y la temperatura posterior al cambio fue 25° C, 29,5° C, 31° C, 32,5° C, o 34° C según se indica. Los cambios de temperatura hacia arriba de entre 1,5° C y 3° C (temperatura final, 29,5° C y 31° C, respectivamente) dieron como resultado titulaciones finales aumentadas. El anticuerpo producido en estos experimentos fue Ab-A. Para el cultivo cambiado a 31° C, la titulación final se aumentó en aproximadamente un 30 % en relación con el cultivo control sin cambio (mantenido a 28° C).

15 La Fig. 41A-B resume la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos con un cambio de temperatura del cultivo de La Fig. 40. La pureza se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo purificado con proteína A recolectado al final de la producción de anticuerpo. El panel A muestra la pureza evaluada bajo condiciones no reductoras. Se detectaron picos correspondientes al anticuerpo completo ("Pico principal de IgG") y dos complejos de anticuerpo aberrantes ("Prepico HHL" y "75kDa HL"). Los números mostrados son porcentajes de la proteína total detectada contenida en cada pico. Una proporción similar de la proteína total estaba contenida en el pico principal de anticuerpo para los cultivos sin cambio (es decir, mantenidos a 28° C) y los cultivos cambiados a 29,5° C y 31° C. El panel B muestra la pureza detectada bajo condiciones reductoras. Para condición de temperatura, se muestra el porcentaje de proteína total detectada contenida en la proteína de la cadena pesada ("HC"), cadena ligera ("LC") y cadena pesada y ligera total ("Total HC+LC"), junto con el porcentaje contenido en otros tres picos ("RT 9,80," "RT 10,16," y "RT 10,80"). En comparación con el cultivo sin cambio mantenido a 28° C, el porcentaje de proteína contenido en los picos de la cadena pesada y ligera permanecieron similares para el cultivo cambiado a 29,5° C y se aumentó en aproximadamente un 4 % para los mayores cambios de temperatura.

La Fig. 42A-C detalla la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos como se muestra en la Fig. 40 para el cultivo con cambio hacia abajo a 25° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para las muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñidos con coomassie para muestras en condiciones no reductoras (carril 1) y en condiciones reductoras (carril 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de tamaño. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Fig. 41.

La Fig. 43A-C detalla la pureza del anticuerpo recombinante como se muestra en la Fig. 40 para el cultivo control producido sin un cambio de temperatura y mantenido a 28° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñido con coomassie para muestras en condiciones no reductoras (carril 1) y en condiciones reductoras (carril 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de tamaño. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Fig. 41.

La Fig. 44A-C detalla la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos como se muestra en la Fig. 40 para el cultivo con cambio hacia arriba en 1,5° C a 29,5° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñido con coomassie para muestras en condiciones no reductoras (carril 1) y en condiciones reductoras (carril 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de tamaño. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Fig. 41.

La Fig. 45A-C detalla la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos como se muestra en la Fig. 40 para el cultivo cambiado hacia arriba en 3° C a 31° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñido con coomassie para muestras en condiciones no reductoras (carril 1) y en condiciones reductoras (carril 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de tamaño. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Fig. 41.

La Fig. 46A-C detalla la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos como se muestra en la Fig. 40 para el cultivo cambiado hacia arriba en 4,5° C a 32,5° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñido

con coomasie para muestras en condiciones no reductoras (carril 1) y en condiciones reductoras (carril 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de peso. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Figura 41.

5 La Figura 47A-C detalla la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos como se muestra en la Figura 40 para el cultivo cambiado hacia arriba en 6° C a 34° C. Panel A, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones no reductoras. Panel B, resultados de electroforesis en gel teñido con coomasie para muestras en condiciones no reductoras (calle 1) y en condiciones reductoras (calle 3). Los carriles 2 y 4 muestran un marcador de tamaño. Panel 3, trazos de cromatografía de exclusión por tamaño y resultados tabulados para muestras en condiciones reductoras. Los resultados de cromatografía están tabulados y se resumen en la Fig. 41.

10 La Fig. 48A-B muestra la mejora en la titulación de Ab-B que resulta de un cambio de temperatura durante el cultivo. Panel A: la titulación de anticuerpo en caldo de cultivo completo (unidades arbitrarias) se muestra gráficamente frente al tiempo en cultivo de una cepa con alta expresión que comprende 4 copias del gen de la cadena pesada de Ab-B y 3 copias del gen de la cadena ligera de Ab-B ("H4/L3"). El cultivo con cambio de temperatura ("H4/L3 30C") mostró una titulación mayor en todos los puntos de tiempo que los dos cultivos no cambiados ("H4/L3 28C"). La titulación de anticuerpo final promedio aumentó en aproximadamente un 28 %. Panel B: la titulación de anticuerpo en caldo de cultivo completo (unidades arbitrarias) se muestra gráficamente frente al tiempo en un cultivo de una cepa con menor expresión que comprende 3 copias del gen de la cadena pesada de Ab-B y 3 copias del gen de la cadena ligera de Ab-B ("H3/L3"). El cultivo con cambio de temperatura ("H3/L3 30C") mostró una titulación mayor que el promedio de los dos cultivos sin cambio ("H3/L3 28C").

15 La Fig. 49 resume la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos con un cambio de temperatura del cultivo como se muestra en la Fig. 48. La pureza se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo purificado con proteína A recolectado al final de la producción de anticuerpo. Los marcadores son como se describen en la Fig. 41.

20 La Fig. 50 muestra mejora en la titulación de Ab-A que resulta de un cambio de temperatura durante el cultivo. La titulación de anticuerpo en caldo de cultivo completo (unidades arbitrarias) se representa frente al tiempo para cultivos que fueron sometidos a un cambio de temperatura durante el cultivo o cultivos controles en los cuales no se realizó un cambio de temperatura. Cuatro cultivos se cambiaron de 28 °C a 30 °C después de iniciar la adición de la alimentación (marcador "30C") y cinco cultivos controles no se cambiaron y se mantuvieron 28 °C durante el cultivo. Cada uno de los cultivos cambiados mostraron titulaciones mayores que los cultivos sin cambio. El aumento promedio en la titulación que se produce a partir del cambio de temperatura fue aproximadamente un 47 %.

25 La Fig. 51 resume la pureza de los anticuerpos recombinantes producidos con un cambio de temperatura del cultivo como se muestra en la Fig. 50. La pureza se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo purificado con proteína A recolectado al final de la producción de anticuerpo. Los marcadores son como se describen en la Fig. 41.

30 La Fig. 52 muestra la temperatura de cada cultivo en el Ejemplo 13 representada frente al tiempo en cultivo.

35 Descripción detallada

Esta descripción describe métodos para mejorar el rendimiento y/o pureza de proteínas expresadas de forma recombinante, que incluyen anticuerpos y otras proteínas con múltiples subunidades. Se proporcionan métodos en donde se realiza un cambio de temperatura durante el cultivo celular. Más adelante, se demuestra que la inclusión de un cambio de temperatura mejora el rendimiento y la pureza de anticuerpos expresados de forma recombinante, en comparación con la expresión en ausencia del cambio.

40 Aunque no se pretende estar limitado por la teoría, se plantea la hipótesis de que un cambio en la temperatura puede provocar cambios sostenidos en la expresión de genes que confieren una mejora duradera en la producción de la proteína recombinante. Dicha mejora puede estar mediada por mejoras en la expresión, estabilidad, plegamiento, procesamiento postraduccional de la proteína y (en el caso de anticuerpos y otros complejos con múltiples subunidades) en el ensamblaje apropiado de subunidades, por ejemplo, debido a un aumento sostenido en la expresión de proteínas de choque térmico.

45 Las células huéspedes preferidas incluyen levaduras y las levaduras particularmente preferidas incluyen cepas de levaduras metilotróficas, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), *Pichia guilliermondii*, *Pichia methanolica*, *Pichia inositovera* y otras (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 4.812.405, 4.818.700, 4.929.555, 5.736.383, 5.955.349, 5.888.768 y 6.258.559). La célula huésped puede producirse por métodos conocidos en la técnica, tales como transformación, cruzamiento, esporulación, etc.

50 En algunos ejemplos, la descripción proporciona métodos que disminuyen la producción de uno o más productos

secundarios no deseados. En relación a la proteína deseada, el o los productos secundarios no deseados pueden exhibir uno o más de: estequiometría alterada (en el caso de un complejo con múltiples subunidades), glicosilación aberrante, diferencias en el peso molecular aparente, diferencias en enlaces disulfuro, diferencias en radio hidrodinámico, fragmentos y/o truncamientos. Los productos secundarios no deseados también pueden exhibir una o más diferencias adicionales. Los productos secundarios no deseados también pueden detectarse por sus efectos en una preparación, por ejemplo, alteración en el nivel de actividad específica, inmunogenicidad, u otros efectos en la constitución física y/o función del complejo con múltiples subunidades deseado.

Por ejemplo, cuando la proteína deseada es un anticuerpo, los productos secundarios no deseados pueden incluir una especie H1L1 o "medio anticuerpo" (es decir, que contiene una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada no está unida por un enlace disulfuro a otra cadena pesada), y/o una especie H2L1 (es decir, que contiene dos cadenas pesadas y una cadena ligera, pero carece de una segunda cadena ligera).

En un ejemplo preferido, la célula huésped puede comprender más de una copia de uno o más de los genes que codifican la proteína deseada o los genes que codifican las subunidades de la misma. Por ejemplo, múltiples copias de un gen que codifica una subunidad pueden estar integradas en tándem en uno o más loci cromosómicos. Las copias de los genes integradas en tándem se retienen preferiblemente en un número de copias estable durante el cultivo que se realiza para producir el complejo con múltiples subunidades. Por ejemplo, una solicitud en copropiedad publicada como US 2013/0045888 describe experimentos en donde el número de copias de los genes generalmente fue estable en las cepas de *P. pastoris* que contenían tres o cuatro copias integradas en tándem de los genes que codificaban la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo.

Uno o más de los genes que codifican la proteína deseada puede estar integrado en uno o múltiples loci cromosómicos de una célula huésped. Para la integración puede utilizarse cualquier locus cromosómico apropiado, incluyendo secuencias intergénicas, secuencias promotoras, secuencias codificadoras, secuencias de terminación, secuencias reguladoras, etc. Los loci cromosómicos ejemplares que pueden usarse en *P. pastoris* incluyen PpURA5; *OCH1*; *AOX1*; *HIS4*; y *GAP*. Los genes codificadores también pueden integrarse en uno o más loci cromosómicos al azar, en lugar de estar dirigidos. En realizaciones ejemplares, los loci cromosómicos se seleccionan del grupo que consiste en el locus pGAP, 3' AOX TT y el locus HIS4 TT. En realizaciones ejemplares adicionales, los genes que codifican las subunidades de la proteína heteróloga pueden estar contenidos en uno o más elementos extracromosómicos, por ejemplo, uno o más plásmidos o cromosomas artificiales.

En algunos ejemplos, la proteína deseada puede ser un complejo con múltiples subunidades que comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subunidades idénticas o no idénticas. Adicionalmente, cada subunidad puede estar presente una o más veces en cada proteína con múltiples subunidades. Por ejemplo, la proteína deseada puede comprender un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas ligeras no idénticas y dos cadenas pesadas no idénticas. Como ejemplo adicional, la proteína deseada puede comprender un anticuerpo que comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

Las subunidades pueden expresarse a partir de genes monocistrónicos, a partir de genes policistrónicos o a partir de cualquier combinación de los mismos. Cada gen policistrónico puede comprender múltiples copias de una misma subunidad, o bien puede comprender una o más copias de cada subunidad diferente.

Se describen métodos ejemplares que pueden usarse para manipular *Pichia pastoris* (incluyendo los métodos de cultivo, de transformación y de apareamiento), por ejemplo, en Solicitudes Publicadas incluyendo U.S. 20080003643, U.S. 20070298500 y U.S. 20060270045, y en Higgins, D. R., y Cregg, J. M., Eds., 1998. *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, y en Cregg, J. M., Ed., 2007, *Pichia* Protocols (2ª edición), Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ.

Un casete de expresión ejemplar que puede utilizarse está compuesto por el promotor del gen de la gliceraldehído deshidrogenasa (gen GAP), fusionado a secuencias que codifican una señal de secreción, seguida por la secuencia del gen que se desea expresar, seguida por secuencias que codifican una señal de terminación transcripcional de *P. pastoris* del gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris*. El gen marcador que confiere resistencia a la zeocina puede proporcionar un medio para el enriquecimiento de cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de transformantes que son resistentes a niveles elevados de zeocina. De manera similar, pueden usarse genes marcadores que confieren resistencia a G418 o a la kanamicina para proporcionar un medio para el enriquecimiento de cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa mediante la selección de transformantes que son resistentes a niveles elevados de geneticina o kanamicina.

Las cepas huésped que pueden utilizarse incluyen las cepas auxotróficas de *P. pastoris* u otras cepas de *Pichia*, por ejemplo, las cepas que tienen mutaciones en *met1*, *lys3*, *ura3* y *ade1* o en otros genes asociados a la auxotrofia. Las

mutaciones preferidas son incapaces de dar lugar a revertantes con una frecuencia apreciable, y preferiblemente son mutantes de delección parcial o incluso más preferiblemente completa. Por ejemplo, las cepas prototróficas diploides o tetraploides se producen apareando conjuntos de cepas auxotróficas complementarias. Dichas cepas tienen la ventaja de tener la capacidad de crecer en medio mínimo, y adicionalmente dicho medio tiende a seleccionar frente al crecimiento de células haploides que pueden surgir por esporulación.

La transformación de las cepas haploides y diploides de *P. pastoris* y la manipulación genética del ciclo sexual de *P. pastoris* pueden llevarse a cabo como se describe en *Pichia* Protocols (1998, 2007), *supra*.

Antes de la transformación, cada vector de expresión puede linealizarse con una enzima de restricción en una región homóloga al locus genómico diana (por ejemplo, la secuencia del promotor GAP) para dirigir la integración de los vectores en el locus diana en la célula huésped. Después, las muestras de cada vector pueden transformarse individualmente en los cultivos de las cepas deseadas por electroporación o u otros métodos, y los transformantes exitosos pueden seleccionarse mediante un marcador seleccionable, por ejemplo, resistencia a un antibiótico o complementación de una auxotrofia. Los aislados pueden recolectarse, sembrarse en estrías para formar colonias individuales en condiciones selectivas y examinarse entonces para confirmar el número de copias del gen que codifica la proteína deseada o la subunidad del complejo con múltiples subunidades deseado (por ejemplo, un anticuerpo deseado) por transferencia Southern o ensayo de PCR en ADN genómico extraído de cada cepa. Opcionalmente, la expresión del producto del gen de la subunidad esperada puede confirmarse, por ejemplo, por FACS, transferencia de Western, selección de colonias e inmunotransferencia u otro método conocido en la técnica. Opcionalmente, los aislados se transforman más veces para introducir genes heterólogos adicionales, por ejemplo, copias adicionales del gen que codifica una proteína deseada, o en el caso de una proteína con múltiples subunidades, los genes que codifican la misma subunidad pueden ser integrados en locus diferentes y/o pueden integrarse copias de una subunidad diferente. Las cepas pueden producirse como haploides, diploides, u otras ploidías (incluyendo tetraploide y ploidías mayores). Las cepas haploides pueden producirse y aparearse con el objetivo de ensayar rápidamente diferentes combinaciones de números de copias de genes, por ejemplo, números de copias de un único gen que codifica una proteína deseada, o números de copias de los diferentes genes que codifican las subunidades de una proteína con múltiples subunidades. La presencia del gen de la proteína deseada o cada uno de los genes que codifican las subunidades esperadas puede confirmarse por medio de transferencia Southern, PCR y otro método de detección conocido en la técnica. Adicionalmente, la expresión de un anticuerpo u otra proteína deseada también puede confirmarse con un método basado en la selección de colonias/inmunotransferencia (Wung et al., *Biotechniques* 21 808-812 (1996)) y/o por FACS.

La transformación se repite opcionalmente para tomar como diana un gen heterólogo en un segundo locus, donde puede ser el mismo gen o un gen diferente del gen que se tomó como diana en el primer locus. Cuando la construcción que se desea integrar en el segundo locus codifica una proteína que es la misma que o es altamente similar a la secuencia codificada por el primer locus, es posible modificar su secuencia para reducir la probabilidad de que ocurra una integración no deseada en el primer locus. Dichas diferencias de secuencia también pueden promover la estabilidad genética por disminución de la probabilidad de eventos posteriores de recombinación. Por ejemplo, la secuencia que se desea integrar en el segundo locus puede presentar diferencias en la secuencia promotora, la secuencia de terminación, el uso de codones, y/u otras diferencias de secuencia tolerables, con relación a la secuencia que se ha integrado en el primer locus.

Para aparear cepas de *P. pastoris* haploides, cada cepa que se va a aparear puede sembrarse conjuntamente en placas de apareamiento. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo convenientemente múltiples apareamientos simultáneos sembrando en estrías cada cepa que se desea aparear en una placa adecuada para su crecimiento, y las parejas de apareamiento pueden sembrarse en estrías en una segunda placa (preferiblemente, las placas comprenden medios ricos, tales como YPD). Típicamente, después de uno o dos días de incubación a 30 °C, pueden sembrarse réplicas de las células de dos placas en una placa de apareamiento de forma cruzada, lo que da lugar a un patrón intercalado con cada pareja de cepas sembrándose en la misma placa y teniendo la oportunidad de aparearse en la intersección de una pareja de líneas de estrías originales. Después, puede incubarse la placa de apareamiento (por ejemplo, a 30 °C) para estimular el inicio del apareamiento entre las cepas. Después de aproximadamente dos días, las células en las placas de apareamiento pueden sembrarse en estrías, manchas o sembrarse en réplicas medios selectivos para las cepas diploides deseadas (por ejemplo, cuando las cepas apareadas presenten auxotrofías complementarias, pueden usarse placas en un medio de exclusión o en un medio mínimo). Estas placas pueden incubarse (por ejemplo, a 30 °C) durante un período apropiado (por ejemplo, aproximadamente tres días) para que tenga lugar el crecimiento selectivo de las cepas diploides deseadas. Las colonias que surjan podrán ser recolectadas y sembradas en estrías para colonias aisladas para aislar y purificar cada cepa diploide.

Los vectores de expresión que pueden usarse en los métodos de la invención también pueden incluir secuencias específicas de levaduras, incluyendo un marcador auxotrófico o de fármaco seleccionable para identificar las cepas de levaduras transformadas. Un marcador de fármaco también puede usarse para amplificar el número de copias del vector en una célula huésped de levadura, por ejemplo, cultivando una población de células en una concentración elevada de

fármaco, seleccionado de esta manera los transformantes que expresan niveles elevados del gen que confiere resistencia.

5 En una realización ejemplar, uno o más de los genes que codifican las subunidades de la proteína heteróloga están acoplados a un promotor inducible. Los promotores ejemplares adecuados incluyen el promotor del gen de la alcohol oxidasa 1, de los genes de la formaldehído deshidrogenasa (FLD; véase la Pub. de los EE UU. No 2007/0298500) y otros promotores inducibles conocidos en la técnica. El promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 está fuertemente reprimido durante el crecimiento de la levadura en la mayoría de las fuentes de carbono comunes, tales como la glucosa, el glicerol o el etanol, pero es inducido notablemente durante el crecimiento en metanol (Tschopp et al., 1987; Pat. de los EE.UU. No. 4.855.231, de Stroman, D. W., et al). Para la producción de proteínas extrañas, las cepas pueden cultivarse inicialmente en una fuente de carbono represora para generar biomasa y después cambiarse a metanol como la única (o principal) fuente de carbono y energía para inducir la expresión del gen extraño. Una ventaja de este sistema de regulación es que las cepas de *P. pastoris* transformadas con genes extraños cuyos productos de expresión son tóxicos para las células pueden mantenerse cuando se las cultiva bajo condiciones represoras.

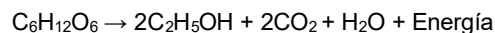
10 En otra realización ejemplar, uno o más de los genes heterólogos pueden estar acoplados a un promotor regulado, cuyo nivel de expresión puede regularse al alza bajo las condiciones apropiadas. Los promotores regulados ejemplares incluyen el promotor CUP1 (inducido por el nivel de cobre en el medio), los promotores inducibles por tetraciclina, los promotores inducibles por tiamina, el promotor AOX1 y el promotor FLD1.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona un proceso para preparar proteínas deseadas en levaduras que puede emplear un tipo particular de mecanismo de control por retroalimentación para aumentar la productividad de las fermentaciones. Ese mecanismo de control por retroalimentación permite el control robusto y preciso del metabolismo aeróbico y fermentativo mixto que estimula la producción óptima del producto deseado. Esto puede usarse con buenos resultados para producir proteínas recombinantes tal como anticuerpos monoclonales en levaduras, particularmente en *Pichia pastoris* y más particularmente usando el promotor del gliceraldehído-3-fosfato (GAP).

25 El proceso que usa el mecanismo de control por retroalimentación se puede aplicar a la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes ensamblados correctamente, de longitud completa, así como a fragmentos de anticuerpos y otras proteínas recombinantes, es decir, distintas del gliceraldehído-3-fosfato. El mecanismo de control que empleamos es fácil de mecanizar y automatizar, eliminando de este modo mucho trabajo en la monitorización y ajuste de las condiciones de fermentación. El proceso se puede aplicar a la producción de una variedad de anticuerpos y otras proteínas deseadas y es fácilmente escalable para acomodar las necesidades de producción comercial, por ejemplo, a gran escala.

30 El proceso de producción puede usar el coeficiente respiratorio (RQ) como una variable de control por retroalimentación. El RQ puede usarse para equilibrar los parámetros de transferencia de masa y/o tasa de alimentación de azúcar fermentable con el objetivo de mantener un estado hipóxico en el cultivo a la vez que se previene la acumulación tóxica de etanol, un subproducto del metabolismo fermentativo. El RQ se define como la tasa molar de dióxido de carbono producido dividido por la tasa molar de oxígeno consumido en el cultivo. Puede medirse por análisis del contenido de dióxido de carbono y oxígeno en los gases de salida que provienen del fermentador. Este parámetro metabólico puede medirse continuamente o intermitentemente durante la fase de crecimiento deseada usando medios fácilmente disponibles. Los ejemplos de intervalos apropiados para las mediciones son cada una hora, cada media hora, cada cuarto de hora, diez minutos, cinco minutos, cuatro minutos, tres minutos, dos minutos, un minuto. Los períodos de tiempo durante las mediciones pueden variar con las condiciones de crecimiento, desde el inicio del cultivo hasta la recolección. Los períodos ejemplares para la medición y control son entre 20 y 40 horas, entre 10 y 60 horas, entre 5 y 70 horas y entre 20 y 110 horas después del inicio del cultivo en el fermentador.

45 Cuando las células de levaduras se crecen en un estado completamente anaeróbico, sin la presencia de oxígeno, se dice que están usando el metabolismo fermentativo para producir la energía que necesitan para crecer. En este caso, se aplica la siguiente ecuación estequiométrica para la conversión de glucosa a etanol:



Cuando las células de levaduras obtienen su energía solamente del metabolismo aeróbico de glucosa, entonces se consume oxígeno y solo se producen dióxido de carbono y agua:



50 En presencia de oxígeno, las células de levaduras usan el metabolismo aeróbico, el cual es más eficiente, es decir, se obtiene más energía a partir de un mol de glucosa bajo el metabolismo aeróbico que bajo el metabolismo fermentativo.

El RQ de un cultivo que produce solo etanol a partir de glucosa se aproxima a infinito (ya que no se consume oxígeno, el

- denominador de RQ es cero), mientras que en el metabolismo puramente aeróbico de glucosa el RQ se aproxima al valor de 1,0 (se consumen tres moles de oxígeno para producir 3 moles de dióxido de carbono). Por lo tanto, los valores mayores de 1 indican una condición metabólica mixta en la cual tanto el metabolismo aeróbico como el metabolismo fermentativo están teniendo lugar simultáneamente. Típicamente, la tasa de transferencia de oxígeno y/o la tasa de alimentación de azúcar fermentable puede ajustarse usando el RQ como una variable del control por retroalimentación para lograr este metabolismo mixto. Usando dicho metabolismo mixto, pueden mantenerse las condiciones hipóxicas. Un estado hipóxico existe cuando hay un nivel bajo de metabolismo fermentativo controlado por el equilibrio de la tasa de transferencia de oxígeno y la tasa de alimentación del azúcar fermentable. Las condiciones hipóxicas pueden definirse por un RQ por encima de 1,0 con oxígeno disuelto por debajo de aproximadamente el 5 %.
- 5 El RQ puede medirse en la corriente de gases de salida de un fermentador. Puede usarse cualquier método conocido y adecuado para determinar la concentración molar de oxígeno consumido y dióxido de carbono generado. Las técnicas ejemplares que pueden usarse son espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja y análisis paramagnético.
- 10 El crecimiento hipóxico tiene un efecto beneficioso sobre la producción de proteínas ensambladas apropiadamente, de longitud completa, tal como anticuerpos, en *Pichia*. Hemos intentado reducir la concentración de oxígeno disuelto simplemente por reducción de la velocidad del agitador durante la fermentación. Sin embargo, de este modo no fue posible obtener un control fiable, debido a que pequeñas diferencias en la tasa de agitación o tasa de alimentación de azúcar fermentable darían lugar rápidamente a la acumulación de niveles tóxicos de etanol.
- 15 Un mecanismo de control por retroalimentación también puede usarse para medir y controlar los niveles de etanol por medio de la modulación bien de la tasa de alimentación de azúcar fermentable y/o la tasa de transferencia de oxígeno, por ejemplo, por la velocidad del agitador. El control de la acumulación de etanol debe permitir un proceso más estable. Con el objetivo de monitorizar los niveles de etanol uno puede usar una sonda insertada en el fermentador. La sonda puede monitorizar continuamente los niveles de etanol en el caldo de cultivo de fermentación. Sin embargo, no es factible usar dicha sonda en la fabricación comercial de moléculas bajo los Procesos de Buenas Prácticas de Fabricación, dado que no tiene una señal de salida que pueda calibrarse suficientemente.
- 20 Cuando el RQ se mantiene en un rango estrecho de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 2, la acumulación de etanol se estabiliza en niveles que no son tóxicos. Preferentemente, la concentración de etanol se mantiene entre aproximadamente 5 g/l y 17 g/l. Adicionalmente, estas mismas condiciones estimulan el promotor de GAP, dando lugar a la proteína deseada aumentada significativamente, por ejemplo, producción de anticuerpo respecto a las condiciones de fermentación aeróbica. Los rangos de RQ que pueden ser deseables incluyen aproximadamente 1,08-2,0; aproximadamente 1,08-1,85; aproximadamente 1,08-1,65; aproximadamente 1,08-1,45; aproximadamente 1,08-1,35; aproximadamente 1,08-1,25; aproximadamente 1,08-1,2; y aproximadamente 1,08-1,15. Las fuentes de carbono alternativas diferentes de glucosa pueden alcanzar un RQ menor de 1. Dichas fuentes de carbono incluyen acetato y glicerol. Otros rangos de RQ adecuados incluyen 1,08 a 1,35 y 1,15 a 1,25. El RQ puede monitorizarse y controlarse durante cualquier porción deseada de la fermentación, por ejemplo, de 0 a 110 horas, de 20-40 horas, de 20-70 horas, de 20-90 horas, de 20-110 horas, o cualquier otro período de tiempo deseado.
- 25 Por lo tanto, el RQ puede manipularse y cambiarse en el tiempo por la adición de diferentes fuentes de carbono, por la adición de diferentes cantidades de una fuente de carbono y por la manipulación de los niveles de oxígeno. En una realización, los niveles de oxígeno se manipulan por aumento o disminución de la agitación. En otra realización, se controla la relación de gas oxígeno a nitrógeno en la alimentación de gases. Las formas en las que la tasa de transferencia de oxígeno puede ajustarse incluyen cambiar la tasa de flujo de aire, la concentración de oxígeno, la densidad celular, la temperatura y la agitación. En otra realización, la alimentación de glucosa u otro azúcar fermentable se modula para afectar el RQ. Otros azúcares fermentables que pueden usarse en la alimentación incluyen sin limitación fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa. La tasa o composición de la alimentación puede modularse para afectar el RQ. El control del RQ puede ser manual o automático.
- 30 Los ácidos nucleicos que codifican una proteína, por ejemplo, que codifican anticuerpos, pueden ser segmentos simples o múltiples continuos o discontinuos de una construcción recombinante. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo de fragmento o construcción o de longitud completa. Estos pueden ser, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fc y ScFv. En algunos ejemplos, las cadenas y o fragmentos de cadena se ensamblarán apropiadamente *in vivo*. Si el ensamblaje no es apropiado, puede ser necesario el ensamblaje *in vitro*. Otras proteínas que pueden hacerse deseablemente son aquellas que tienen una o más subunidades, ya sean heteroméricas u homoméricas. Típicamente, la proteína será útil para propósitos diagnósticos o terapéuticos. La proteína puede ser un factor de crecimiento, una citoquina, un factor de coagulación sanguíneo, una toxina terapéutica, una proteína estructural útil para la reconstrucción, una enzima, etc.
- 35 Las proteínas tales como anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo deplecionado de células o de las células por cualquier técnica conocida en la técnica. Típicamente, se usará una etapa de unión para reducir el volumen de la preparación. La unión puede hacerse sobre filtros o columnas u otros soportes sólidos, como sea conveniente. En
- 40
- 45
- 50
- 55

algunas realizaciones, la proteína A puede usarse como un agente de captura de anticuerpo. La proteína A puede unirse a una matriz polimérica.

Puede usarse cualquier tipo de células de levadura, incluyendo especies de *Saccharomyces*, *Hansenula* y *Pichia*. Las especies ejemplares, pero no limitantes, que pueden usarse son *P. pastoris*, *P. methanolica*, *P. angusta*, *P. thermomethanolica*, *Hansenula polymorpha* y *S. cerevisiae*. La levadura puede ser haploide o diploide.

Pueden usarse de forma similar otros promotores como GAP. Estos son típicamente promotores que son para los genes que están en regulados al alza en crecimiento hipóxico con glucosa limitante en células de levaduras, tal como *Pichia*. Dichos promotores que pueden usarse incluyen, sin limitación, los promotores para los genes YHR140W, YNL040W, NTA1, SGT1, URK1, PGI1, YHR112C, CPS1, PET18, TPA1, PFK1, SCS7, YIL166C, PFK2, HSP12, ERO1, ERG11, ENO1, SSP120, BNA1, DUG3, CYS4, YEL047C, CDC19, BNA2, TDH3, ERG28, TSA1, LCB5, PLB3, MUP3, ERV14, PDX3, NCP1, TPO4, CUS1, COX15, YBR096W, DOG1, YDL124W, YMR244W, YNL134C, YEL023C, PIC2, GLK1, ALD5, YPR098C, ERG1, HEM13, YNL200C, DBP3, HAC1, UGA2, PGK1, YBR056W, GEF1, MTD1, PDR16, HXT6, AQR1, YPL225W, CYS3, GPM1, THI11, UBA4, EXG1, DGK1, HEM14, SCO1, MAK3, ZRT1, YPL260W, RSB1, AIM19, YET3, YCR061W, EHT1, BAT1, YLR126C, MAE1, PGC1, YHL008C, NCE103, MIH1, ROD1, FBA1, SSA4, PIL1, PDC1-3, THI3, SAM2, EFT2 e INO1.

Los procesos de fermentación a gran escala son aquellos usados típicamente en procesos comerciales para producir un producto útil. Típicamente, estos son mayores de 100 litros de volumen. La fermentación con alimentación discontinua es un proceso por el cual se añaden nutrientes durante la fermentación para afectar a la densidad celular y la acumulación de producto.

Se hace referencia a las descripciones de las solicitudes de patente y patentes previamente publicadas, U.S. 7927863, U.S. 8268582, Solicitud de los EE.UU. 2012/0277408.

Aunque la mayor parte de la presente descripción describe la producción de anticuerpos, los métodos que se describen en la presente memoria pueden adaptarse fácilmente a otras proteínas deseadas que incluyen proteínas con subunidades únicas y con múltiples subunidades. Adicionalmente, los presentes métodos no se limitan a la producción de complejos que comprenden múltiples proteínas, sino que también pueden adaptarse fácilmente para uso con complejos de ribonucleoproteínas (RNP), incluyendo telomerasa, hnRNP, ribosomas, snRNP, partículas capaces de reconocer señales, complejos que comprenden ARNasa P procariotas y eucariotas y cualesquiera otros complejos que contienen diversas subunidades diferentes proteicas y/o de ARN. La célula huésped que expresa un complejo con múltiples subunidades puede producirse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede generarse un panel de células de levaduras diploides o tetraploides que contienen diferentes combinaciones de números de copias de genes apareando células que contienen diversos números de copias de los genes que codifican las subunidades individuales (donde los números de copias preferiblemente se conocen antes de realizar el apareamiento).

Definiciones

Tal y como se usan en la presente memoria, las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias en plural, a menos que contexto dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, una referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células, y una referencia a “una proteína” incluye una referencia a una o más proteínas y equivalentes de la misma conocidos por los expertos en la técnica, etc. Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención, a no ser que se indique claramente otra cosa.

Adición de un bolo: en la presente descripción, “adición de un bolo” generalmente hace referencia a un cambio rápido en la concentración de una sustancia (tal como el etanol) que se encuentra en contacto con las células cultivadas (por ejemplo, en un medio de cultivo). Por ejemplo, la sustancia puede añadirse a las células cultivadas en una sola adición, en más de una adición y/o infundirse durante un período de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90 o 120 minutos). La sustancia también puede añadirse reemplazando parcial o completamente el medio de cultivo, por ejemplo, al concentrar las células (usando centrifugación, filtración, sedimentación u otros métodos), al remover una parte o la totalidad del medio y añadir la sustancia o al añadir las células a un medio que contiene la sustancia. La sustancia puede mezclarse con un vehículo (por ejemplo, medio de cultivo, agua, disolución salina, etc.). Por ejemplo, la adición de un bolo de etanol puede comprender la adición de etanol puro o concentrado (por ejemplo, 100 %, 95 %, 70 %, 50 %, 60 %, 40 %, 30 %, 20 %, etc.) al medio de cultivo, en una cantidad suficiente para producir la concentración deseada. Como otro ejemplo, las células pueden añadirse a un medio que contiene etanol, por ejemplo, por la adición de un inóculo que contiene las células a un medio que contiene etanol.

Concentración de un bolo: en la presente descripción, “concentración de un bolo” generalmente hace referencia a la concentración que se obtiene al añadir un bolo de una sustancia (por ejemplo, etanol).

- 5 Apareamiento de especies de levadura competentes: en la presente descripción, se pretende que esta incluya ampliamente cualquier levadura diploide o tetraploide que pueda crecerse en cultivo. Dichas especies de levaduras pueden existir en una forma haploide, diploide u otra forma poliploide. Bajo condiciones apropiadas, las células con una ploidía dada pueden proliferar en la misma forma durante un número indefinido de generaciones. Las células diploides también pueden esporular para formar células haploides. El apareamiento secuencial puede dar como resultado cepas tetraploides, a través del apareamiento adicional o la fusión de cepas diploides. La presente invención contempla el uso de células de levaduras haploides, así como levaduras diploides o poliploides, producidas, por ejemplo, por medio de un apareamiento o una fusión (por ejemplo, fusión de esferoplastos).
- 10 En un ejemplo de la invención, la levadura competente para el apareamiento es un miembro de la familia *Saccharomycetaceae*, que incluye los géneros *Arxiozyma*; *Ascobotryozyma*; *Citeromyces*; *Debaryomyces*; *Dekkera*; *Eremothecium*; *Issatchenkia*; *Kazachstania*; *Kluyveromyces*; *Kodamaea*; *Lodderomyces*; *Pachysolen*; *Pichia*; *Saccharomyces*; *Saturnispora*; *Tetrapispora*; *Torulasporea*; *Williopsis*; y *Zygosaccharomyces*. Otros tipos de levaduras potencialmente útiles en la invención incluyen *Yarrowia*; *Rhodospiridium*; *Candida*; *Hansenula*; *Filobasium*; *Sporidiobolus*; *Bullera*; *Leucosporidium* y *Filobasidella*.
- 15 En un ejemplo preferido de la invención, la levadura competente para el apareamiento es un miembro del género *Pichia* o es otra levadura metilotrófica. En un ejemplo preferido adicional, la levadura competente para el apareamiento del género *Pichia* es una de las siguientes especies: *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* o *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). En un ejemplo particularmente preferido, la levadura competente para el apareamiento del género *Pichia* es la especie *Pichia pastoris*.
- 20 Célula de levadura haploide: una célula que tiene una única copia de cada gen en su complemento genómico (cromosómico) normal.
- Célula de levadura poliploide: una célula que tiene más de una copia de su complemento genómico (cromosómico) normal.
- 25 Célula de levadura diploide: una célula que tiene dos copias (alelos) de esencialmente cada gen de su complemento genómico normal, formada típicamente por el proceso de fusión (apareamiento) de dos células haploides.
- 30 Célula de levadura tetraploide: una célula que tiene cuatro copias (alelos) de esencialmente cada gen de su complemento genómico normal, formada típicamente por el proceso de fusión (apareamiento) de dos células diploides. Las células tetraploides pueden contener dos, tres, cuatro o más casetes de expresión diferentes. Dichas células tetraploides pueden obtenerse en *S. cerevisiae* mediante el apareamiento selectivo de células diploides homocigotas heterotéticas *a/a* y *alfa/alfa*, y en *Pichia* mediante el apareamiento secuencial de células haploides, para obtener células diploides auxotróficas. Por ejemplo, es posible aparear una célula haploide [met his] con una célula haploide [ade his] para obtener una célula diploide [his], y una célula haploide [met arg] puede aparearse con una célula haploide [ade arg] para obtener una célula diploide [arg]; posteriormente, la célula diploide [his] puede aparearse con la célula diploide [arg] para obtener una célula tetraploide prototrófica. Los expertos en la técnica entenderán que las referencias a los beneficios y los usos de las células diploides también pueden aplicarse a las células tetraploides.
- 35 Apareamiento de levaduras: el proceso por el cual se fusionan dos células de levadura para formar una única célula de levadura. Las células fusionadas pueden ser células haploides o células con una ploidía superior (por ejemplo, el apareamiento de dos células diploides para producir una célula tetraploide).
- 40 Meiosis: el proceso por el cual una célula de levadura diploide atraviesa una fase de división reductora para formar cuatro productos de esporas haploides. Cada espora puede germinar posteriormente y formar una línea de células haploides que crecen de manera vegetativa.
- 45 Marcador seleccionable: un marcador seleccionable es un gen o un fragmento de un gen que le confiere un fenotipo de crecimiento (una característica física asociada al crecimiento) a la célula que recibe el gen como, por ejemplo, a través de un evento de transformación. El marcador seleccionable permite que la célula sobreviva y crezca en un medio de crecimiento selectivo, bajo condiciones que no posibilitarían el crecimiento de las células que no hubieran recibido el gen del marcador seleccionable. Los genes de los marcadores seleccionables generalmente se clasifican en diversos tipos, que incluyen los genes de los marcadores seleccionables positivos, tales como un gen que confiere a una célula resistencia a un antibiótico u otro fármaco, temperatura cuando se aparean dos mutantes sensibles a la temperatura ("ts") o cuando se transforma un mutante ts; genes de marcadores seleccionables negativos, tales como un gen biosintético que confiere a una célula la capacidad de crecer en un medio sin un nutriente específico, necesario para todas las células que no tienen ese gen biosintético, o un gen biosintético mutagenizado, que confiere a una célula la incapacidad de crecer como lo harían las células que no tienen el gen de tipo salvaje; y semejantes. Los marcadores apropiados incluyen, pero no están limitados a, ZEO; NEO (G418); LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; y semejantes.
- 50

Integrado: un elemento genético (típicamente, un elemento genético heterólogo) que está unido covalentemente en un cromosoma de un organismo.

Integrado en tándem: dos o más copias de un elemento genético que están integradas en localizaciones adyacentes en un cromosoma. Las dos o más copias no tienen necesariamente la orientación; por ejemplo, para genes transcritos, algunas copias pueden transcribirse a partir de la cadena de Watson y otras a partir de la cadena de Crick.

Célula huésped: en el contexto de la presente descripción, el término célula huésped hace referencia a una célula (por ejemplo, una célula eucariota, tal como una célula de *Pichia*) que contiene un gen heterólogo. Por ejemplo, el gen heterólogo puede proporcionar la expresión de una subunidad de un complejo con múltiples subunidades deseado, un gen implicado en el plegamiento (por ejemplo, una chaperona), expresión o secreción de proteínas, y/u otro gen deseado. El gen heterólogo puede estar integrado en el genoma de la célula eucariota o puede estar contenido en un elemento extracromosómico, tal como un plásmido o un cromosoma artificial.

El coeficiente respiratorio (RQ), se define como el número de moles de CO₂ producidos dividido por el número de moles de O₂ consumidos. Para la oxidación completa de hidratos de carbono, el valor de RQ es 1,0. La fermentación está indicada por valores de RQ mayores de uno, y sin o con baja utilización de O₂ (por ejemplo, para el metabolismo en ausencia de oxígeno molecular), el RQ puede alcanzar valores muy grandes o valores teóricamente infinitos.

Vector de expresión: estos vectores de ADN contienen elementos que facilitan la manipulación para la expresión de una proteína extraña en la célula huésped diana. Convenientemente, la manipulación de las secuencias y la producción del ADN para la transformación se efectúan primero en un huésped bacteriano, por ejemplo, *E. coli*, y los vectores frecuentemente incluirán secuencias que facilitan dichas manipulaciones, incluyendo un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano apropiado. Los marcadores de selección codifican proteínas necesarias para la supervivencia y el crecimiento de las células huésped transformadas crecidas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos, que no están disponibles en los medios complejos. Se describen vectores ejemplares y métodos para la transformación de levaduras, por ejemplo, en Burke, D., Dawson, D., y Stearns, T. (2000), *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los vectores de expresión para uso en los métodos de la invención también pueden incluir secuencias específicas de levaduras, incluyendo un marcador seleccionable auxotrófico o relacionado con fármacos, para identificar las cepas de levadura transformadas. Un marcador de fármacos puede usarse además para seleccionar la amplificación del número de copias del vector en una célula huésped de levadura.

La secuencia que codifica el polipéptido de interés típicamente se encuentra operativamente ligada a secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, que proporcionan la expresión del polipéptido en las células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. También pueden incluirse secuencias para la secreción del polipéptido, por ejemplo, una secuencia señal, y semejantes. Un origen de replicación de levaduras es opcional, ya que los vectores de expresión frecuentemente se integran en el genoma de la levadura.

Aunque es opcional, en un ejemplo, la proteína deseada o una subunidad del complejo con múltiples subunidades deseado se liga, o fusiona, operativamente a una secuencia de secreción que proporciona la secreción del polipéptido expresado en el medio de cultivo, con lo que puede facilitarse la recolección y la purificación de la proteína o complejo deseado. Aún más preferiblemente, estas secuencias de secreción proporcionan la secreción optimizada del polipéptido desde las células huésped (por ejemplo, células de levaduras diploides), tal como mediante la selección de los codones preferidos y/o mediante la alteración del porcentaje de AT a través de la selección de los codones. En la técnica se sabe que la eficiencia y/o la estabilidad de la secreción pueden verse afectadas por la secuencia de secreción seleccionada y la secuencia de secreción óptima variar entre diferentes proteínas (véase, por ejemplo, Koganesawa et al., *Protein Eng.*, sep. de 2001; 14(9):705-10). En la técnica se conocen muchas señales de secreción potencialmente adecuadas y cuyo efecto sobre el rendimiento y/o la pureza de la proteína o complejo deseado particular puede evaluarse con facilidad. Puede usarse potencialmente cualquier secuencia de secreción, incluyendo las presentes en las proteínas secretadas por las levaduras o por otras especies, así como las secuencias de secreción preparadas por ingeniería. Las secuencias con señal de secreción ejemplares que pueden utilizarse incluyen: el péptido señal de la lisozima del pollo (CLY) (MRSLILVLCFLPLAALG (SEQ ID NO: 5)), CLY-L8 (MRLLLLLLLLPLAALG (SEQ ID NO: 6)), el péptido señal de la invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2) (MLLQAFLLLAGFAAKISA (SEQ ID NO: 7)), MF-alfa (Prepro) (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR (SEQ ID NO: 8)), MF-alfa (Pre)-apv (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APV (SEQ ID NO: 9)), MF-alfa (Pre)-apv-SLEKR (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVSLEKR (SEQ ID NO: 10)), MF-alfa (Prepro)-(EA)₃ (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR-EAEAEA (SEQ ID NO: 11)), el péptido señal de αF

(MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-DETAQIPAEAVIGYSLEGLDFDVAVLPFNSNSTNNGLLFINTTASIAAKE-EGVSLEKR (SEQ ID NO: 12)), el péptido señal de KILM1 (MTKPTQVLVRSVSVILFFITLLHLVVALNDVAGPAETAPVSSLPR (SEQ ID NO: 13)), el péptido señal de la fosfatasa ácida reprimible (PHO1) (MFSPILSLEIILALATLQSVFA (SEQ ID NO: 14)), el péptido señal de la GOX de *A. niger* (MQTLLVSSLVSLAALPHYIR (SEQ ID NO: 15)), el péptido señal del gen de la glucoamilasa de *Schwanniomyces occidentalis* (GAM1) (MIFLKLKISIVIGLGLVSAIQA (SEQ ID NO: 16)), el péptido señal de la albúmina del suero humano (HSA) con su prosequencia (MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRR (SEQ ID NO: 17)), el péptido señal de la albúmina del suero humano (HSA) sin su prosequencia (MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 18)), el péptido señal de la ISN (MALWMRLLPLLALLLWGPDPAAA (SEQ ID NO: 19)), el péptido señal del IFN (MKYTSYILAFQLCIVLGLSGLCDLP (SEQ ID NO: 20)), el péptido señal de la HGH (MAADSQTPWLLTFSLCLLWPQEPGA (SEQ ID NO: 21)), fitohemaglutinina (PHA) (MKKNRMMMMWSVGVVWMLLLVGGSYG (SEQ ID NO: 22)), lisozima del gusano de seda (MQKLIIFALVVLVCGSEA (SEQ ID NO: 23)), lisozima humana (LYZ1) (MKALIVLGLVLLSVTVQG (SEQ ID NO: 24)), receptor de la activina del tipo I (MVDGVMILPVLIMIALPSPS (SEQ ID NO: 25)), receptor de la activina del tipo II (MGAAAKLAFVFLISCSG (SEQ ID NO: 26)), la proteína de unión a inmunoglobulina de *P. pastoris* (PpBiP) (MLSLKPSWLTALMYAMLLVVPFAKPVRA (SEQ ID NO: 27)) y el líder de la cadena ligera del anticuerpo humano 3D6 (MDMRVPAQLLGLLLWLPGAKC (SEQ ID NO: 28)). Véanse Hashimoto et al., Protein Engineering, vol. 11, no. 2, páginas 75-77, 1998; Oka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., nov. de 1999; 63(11):1977-83; Gellissen et al., FEMS Yeast Research 5 (2005) 1079-1096; Ma et al., Hepatology, dic. de 2005; 42(6):1355-63; Raemaekers et al., Eur. J. Biochem., 1 de oct. de 1999; 265(1):394-403; Koganesawa et al., Protein Eng. (2001) 14 (9): 705-710; Daly et al., Protein Expr. Purif., abr. de 2006; 46(2):456-67; Damasceno et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 74:381-389; y Felgenhauer et al., Nucleic Acids Res., 25 de ago. de 1990; 18(16):4927.

La proteína o complejo deseado también podrá ser secretado en el medio de cultivo sin que esté ligado o fusionado operativamente a una señal de secreción. Por ejemplo, se ha demostrado que algunos polipéptidos heterólogos se secretan en el medio de cultivo cuando se expresan en *P. pastoris* incluso sin que estén ligados o fusionados a una señal de secreción. Adicionalmente, la proteína o complejo con múltiples subunidades deseado puede purificarse de las células huésped (lo cual puede resultar preferible, por ejemplo, si el complejo es secretado a bajo nivel) usando métodos conocidos en la técnica.

Los medios o las células que comprenden la proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado pueden recuperarse del cultivo. Opcionalmente, es posible purificar las proteínas secretadas. Por ejemplo, las células que comprenden la proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado pueden lisarse usando métodos mecánicos, químicos, enzimáticos y/u osmóticos (por ejemplo, por medio de un congelamiento con nitrógeno líquido, mediante el uso de un homogeneizador, a través de la formación de esferoplastos, por medio de una sonicación, con una agitación en presencia de esferas de vidrio, mediante el uso de detergentes, etc.). La proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado puede concentrarse, filtrarse, dializarse, etc., usando métodos conocidos en la técnica. La proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado puede purificarse, por ejemplo, sobre la base de su masa molecular (por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño), punto isoeléctrico (por ejemplo, mediante un enfoque isoeléctrico), movilidad electrofórica (por ejemplo, electroforesis en gel), cromatografía de interacción hidrofóbica (por ejemplo, HPLC), carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico), afinidad (por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, unión a la proteína A, proteína G y/o un epítipo al que se une el anticuerpo deseado) y/o estado de glicosilación (por ejemplo, detectado por afinidad de unión a lectina). Pueden realizarse múltiples etapas de purificación para obtener el nivel de pureza deseado. En un ejemplo, la proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado puede ser el dominio constante de una inmunoglobulina y puede purificarse usando afinidad por la proteína A o proteína G, cromatografía de exclusión por tamaño y ausencia de unión a la lectina (para eliminar las formas glicosiladas). Opcionalmente, puede añadirse un inhibidor de la proteasa A, tal como el fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación.

Los ácidos nucleicos están "ligados unidos" cuando se encuentran en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una secuencia señal está ligado operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador están ligados operativamente a una secuencia codificadora si afectan la transcripción de la secuencia. En general, el término "ligado operativamente" denota que las secuencias de ADN que están ligadas se encuentran contiguas, y en el caso de un líder de secreción, que se encuentran contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, no es imprescindible que los potenciadores se encuentren contiguos. La unión puede efectuarse por ligación en sitios de restricción convenientes o alternativamente por un método de PCR/recombinación que es familiar para los expertos en la técnica (Gateway® Technology; Invitrogen, Carlsbad Calif.). Si dichos sitios no existen, pueden usarse adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional. Los ácidos nucleicos deseados (incluyendo ácidos nucleicos que comprenden secuencias ligadas operativamente) también pueden producirse por síntesis química.

Los promotores son secuencias no traducidas que están localizadas aguas arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente a una distancia aproximada de entre 100 y 1.000 pb), que controlan la transcripción y la

traducción de las secuencias de ácidos nucleicos particulares a las que están ligados operativamente. Dichos promotores se encuentran en distintas clases: los promotores inducibles, constitutivos y reprimibles (que incrementan los niveles de transcripción en respuesta a la ausencia de un represor). Los promotores inducibles pueden iniciar niveles de transcripción incrementados a partir del ADN bajo su control, en respuesta a algún cambio en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o la ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

El fragmento promotor de levadura también puede servir como un sitio para la recombinación homóloga y la integración del vector de expresión en el mismo sitio en el genoma de la levadura; alternativamente, se usa un marcador seleccionable como el sitio para la recombinación homóloga. La transformación de *Pichia* se describe en Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385.

Los ejemplos de promotores de *Pichia* apropiados incluyen el CUP1 (inducido por el nivel de cobre en el medio), los promotores inducibles por tetraciclina, los promotores inducibles por tiamina, el promotor AOX1 (Cregg et al. (1989) Mol. Cell. Biol., 9:1316-1323); el promotor ICL1 (Menendez et al. (2003) Yeast 20(13):1097-108); el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) (Waterham et al. (1997) Gene 186(1):37-44); y el promotor de FLD1 (Shen et al. (1998) Gene 216(1):93-102). El promotor de GAP es un promotor constitutivo fuerte, y los promotores de CUP1, AOX y FLD1 son inducibles.

Otros promotores de levaduras incluyen los promotores de ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5, Pyk y los promotores quiméricos derivados de éstos. Además, en la invención pueden usarse promotores que no provienen de las levaduras, tales como los promotores de mamíferos, insectos, plantas, reptiles, anfibios, virales y de aves. Más típicamente, el promotor comprenderá un promotor de mamífero (potencialmente endógeno con relación a los genes expresados) o comprenderá un promotor de levadura o viral, que proporciona una transcripción eficiente en los sistemas de levaduras.

Los polipéptidos de interés pueden producirse por medios recombinantes, no solamente de manera directa, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede formar parte de la secuencia que codifica el polipéptido que está insertada en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada por una de las rutas estándar que se encuentran disponibles en la célula huésped. Se ha demostrado que la señal del preprofactor alfa de *S. cerevisiae* es efectiva en la secreción de una variedad de proteínas recombinantes de *P. pastoris*. Otras secuencias señal de levaduras incluyen la secuencia señal del factor de apareamiento alfa, la secuencia señal de la invertasa y las secuencias señal derivadas de otros polipéptidos secretados de levaduras. Además, estas secuencias señal peptídicas pueden ser preparadas por ingeniería para proporcionar una secreción aumentada en los sistemas de expresión de levaduras diploides. Otras señales de secreción de interés también incluyen las secuencias señal de los mamíferos, que pueden ser heterólogas con relación a la proteína que se desea secretar, o puede ser una secuencia nativa con relación a la proteína que se desea secretar. Las secuencias señal incluyen secuencias de prepeptidos, y en algunos casos, pueden incluir secuencias de propéptidos. Muchas de dichas secuencias señal son conocidas en la técnica, incluyendo las secuencias señal que están presentes en las cadenas de las inmunoglobulinas, por ejemplo, la secuencia de la preprotoxina K28, las secuencias señal de PHA-E, FACE, MCP-1 humana, albúmina de suero humana, cadena pesada de las Ig humanas, cadena ligera de las Ig humanas y semejantes. Véanse, por ejemplo, Hashimoto et al., Protein Eng. 11(2) 75 (1998); y Kobayashi et al., Therapeutic Apheresis 2(4) 257 (1998).

La transcripción puede incrementarse insertando una secuencia activadora de la transcripción en el vector. Estos activadores son elementos de ADN que actúan en cis, que frecuentemente tienen una longitud aproximada de entre 10 y 300 pb, que actúan como un promotor para incrementar su transcripción. Los potenciadores de la transcripción son relativamente independientes de la orientación y de la posición, ya que es posible hallarlos en posiciones 5' y 3' con relación a la unidad de transcripción, en un intrón, así como en propia secuencia codificadora. El potenciador puede unirse al vector de expresión en una posición 5' o 3' con relación a la secuencia codificadora, pero preferiblemente se localiza en un sitio 5' respecto al promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas también pueden contener las secuencias necesarias para terminar la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias comúnmente se encuentran disponibles desde el extremo 3' hasta el codón de terminación de la traducción, en regiones no traducidas de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm.

La construcción de los vectores apropiados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de ligación o métodos de PCR/recombinación estándar. Los plásmidos o los fragmentos de ADN aislados se escinden, se personalizan y se ligan nuevamente en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos o con métodos de recombinación. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos

construidos, se usan las mezclas de ligación para transformar células huésped, y los transformantes exitosos se seleccionan por su resistencia a antibióticos (por ejemplo, ampicilina o Zeocina), de ser apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan por digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian.

5 Como una alternativa a la restricción y la ligación de los fragmentos, pueden usarse métodos de recombinación basados en sitios att y enzimas de recombinación para insertar las secuencias de ADN en un vector. Dichos métodos se describen, por ejemplo, por Landy (1989) Ann. Rev. Biochem. 58: 913-949; y son conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos utilizan la recombinación intermolecular del ADN, que está mediada por una mezcla de proteínas de recombinación codificadas por *E. coli* y lambda. La recombinación tiene lugar entre sitios de unión específicos (att) en las moléculas de ADN participantes. Puede hallarse una descripción de los sitios att en Weisberg y
10 Landy (1983) Site-Specific Recombination in Phage Lambda, en Lambda II, Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press), páginas 211-250. Los segmentos de ADN que flanquean los sitios de recombinación se cambian, de modo que, después de la recombinación, los sitios att son secuencias híbridas comprendidas por secuencias donadas por cada vector parental. La recombinación puede tener lugar entre fragmentos de ADN con cualquier topología.

15 Los sitios att pueden introducirse en una secuencia de interés ligando la secuencia de interés en un vector apropiado; generando un producto de PCR que contiene sitios att B mediante el uso de cebadores específicos; generando una biblioteca de ADNc clonada en un vector apropiado que contiene sitios att; y semejantes.

20 Genes monocistrónicos y policistrónicos. Un gen monocistrónico codifica un ARN que contiene la información genética para traducir solo una única proteína. Un gen policistrónico codifica un ARNm que contiene la información genética para traducir más de una proteína. Las proteínas codificadas en un gene policistrónico pueden tener secuencias idénticas o diferentes, o una combinación de las mismas. Dicistrónico" y bicistrónico hace referencia a un gen policistrónico que codifica dos proteínas. Los genes policistrónicos opcionalmente incluyen uno o más sitios de entrada en los ribosomas internos (IRES) para facilitar el inicio de la traducción independientemente de la presencia de caperuza, que pueden estar localizados en una posición que puede dirigir la traducción de la región codificadora de la proteína en 3'
25 independientemente de la estructura de caperuza en 5' unida al extremo 5' de la molécula de ARNm. Puede usarse cualquier secuencia IRES conocida (por ejemplo, de origen viral, eucariota o artificial). Por ejemplo, puede emplearse la secuencia IRES del virus de la parálisis del grillo en la región intergénica (IGR), según se describe en Thompson et al. (2001) PNAS 98:12972-12977. Opcionalmente, la función IRES puede potenciarse a través de una alteración genética, por ejemplo, causando la expresión constitutiva de una quinasa eIF2 GCN2 o disruptiendo dos genes de ARNt iniciador
30 (met) disruptidos (*id.*)

Plegamiento, tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a la estructura tridimensional de los polipéptidos y de las proteínas, donde las interacciones entre los residuos de aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Si bien las interacciones no covalentes son importantes para determinar la estructura, las proteínas de interés frecuentemente tendrán enlaces covalentes disulfuro intramoleculares y/o intermoleculares formados por dos residuos de
35 cisteína. Para las proteínas y los polipéptidos naturales o derivados y variantes de los mismos, el plegamiento apropiado típicamente es el ordenamiento que da lugar a la actividad biológica óptima, y puede ser monitorizado convenientemente por ensayos para determinar la actividad, por ejemplo, unión de un ligando, actividad enzimática, etc.

40 En algunos casos, por ejemplo, cuando el producto deseado sea de origen sintético, los ensayos basados en la actividad biológica serán menos importantes. El plegamiento apropiado de dichas moléculas puede determinarse sobre la base de las propiedades físicas, consideraciones energéticas, estudios de modelado y semejantes.

El huésped de expresión puede modificarse adicionalmente introduciendo secuencias que codifican una o más enzimas que aumentan el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, es decir, plegasas o chaperoninas, PDI, BIP, ciclofilina, etc. Dichas secuencias pueden expresarse de manera constitutiva o inducible en la célula huésped de levadura, usando vectores, marcadores, etc., como se conoce en la técnica. Preferiblemente, las secuencias, incluyendo
45 los elementos reguladores de la transcripción que son suficientes para obtener el patrón de expresión deseado, se integran de manera estable en el genoma de la levadura, por medio de una metodología dirigida.

Por ejemplo, la PDI eucariota no solamente es un catalizador eficiente de la oxidación de las cisteínas y de la isomerización de los enlaces disulfuro de las proteínas, sino que también presenta actividad de chaperona. Mediante la coexpresión de la PDI, puede facilitarse la producción de proteínas activas que tienen múltiples enlaces disulfuro.
50 También resulta de interés la expresión de la BIP (proteína de unión a la cadena pesada de las inmunoglobulinas); de la ciclofilina; y semejantes. En un ejemplo, el complejo con múltiples subunidades puede expresarse a partir de una cepa de levadura que se produce por medio de un apareamiento, en donde cada una de las cepas haploides parentales expresa una enzima de plegamiento diferente, por ejemplo, una cepa puede expresar la BIP y la otra cepa puede expresar la PDI, o combinaciones de las mismas.

Los términos “proteína deseada” o “proteína diana” se emplean indistintamente, y generalmente hacen referencia a una proteína con múltiples subunidades heterólogas, tal como un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo humanizado) o una porción de unión del mismo descrito en la presente memoria.

5 El término “anticuerpo” incluye cualquier estructura molecular que contiene una cadena de polipeptídica con una forma específica, que se ajusta a y reconoce un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. La molécula del anticuerpo arquetípico es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc., de todas las fuentes, por ejemplo, de seres humanos, roedores, conejos, vacas, ovejas, cerdos, perros, otros mamíferos, pollos, otras aves, etc., se consideran “anticuerpos”.
 10 Una fuente preferida para producir anticuerpos útiles como material de partida son los conejos. Se han descrito numerosas preferencias que codifican anticuerpos; y es posible generar otras por métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y otros anticuerpos de mamíferos no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única tales como scFv, anticuerpos de camello, nanocuerpos, IgNAR (anticuerpos de cadena única derivados de tiburones), inmunofármacos modulares pequeños (SMIP) y fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y semejantes. Véanse Streltsov, V. A., et al., Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype, Protein Sci., noviembre de 2005; 14(11): 2901-9, Publicación electrónica del 30 de sep. de 2005; Greenberg, A. S., et al., A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, Nature, 9 de marzo de 1995,; 374(6518): 168-73; Nuttall, S. D., et al., Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks and use as a scaffold for the display of proteína loop libraries, Mol. Immunol., agosto de 2001; 38(4):313-26; Hamers-Casterman, C., et al., Naturally occurring antibodies devoid of lighth chains, Nature, junio de 1993, 3; 363(6428): 446-8; Gill, D. S., et al., Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, Curr. Opin. Biotechnol., diciembre de 2006; 17(6):653-8, Publicación electrónica del 19 de octubre de 2006.

Por ejemplo, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno pueden producirse mediante ingeniería genética. En esta técnica, al igual que con otros métodos, las células productoras de anticuerpos se sensibilizan al antígeno o al inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células productoras de anticuerpos se usa como molde para obtener el ADNc, usando amplificación por PCR. Se produce una biblioteca de vectores, cada uno de las cuales contiene un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera que retienen la especificidad por el antígeno inicial, por medio de la inserción de las secciones apropiadas del ADNc de la inmunoglobulina que se ha amplificado en los vectores de expresión. Se construye una biblioteca de combinación combinando la biblioteca de genes de cadena pesada con una biblioteca de genes de cadena ligera. Esto da como resultado una biblioteca de clones que coexpresan una cadena pesada y una cadena ligera (semejante al fragmento Fab o al fragmento de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que portan estos genes se cotransfectan en una célula huésped. Cuando se induce la síntesis del gen del anticuerpo en el huésped transfectado, las proteínas de la cadena pesada y de la cadena ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos, los cuales pueden ser detectados por cribado con el antígeno o con el inmunógeno.
 35

Las secuencias que codifican el anticuerpo de interés incluyen las codificadas por secuencias nativas, así como ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, no presentan una secuencia idéntica a la de los ácidos nucleicos que se describen, y variantes de los mismos. Los polipéptidos variantes pueden incluir sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (aa). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales, de manera que se altera un sitio de glicosilación o se minimiza un plegamiento erróneo por sustitución o deleción de uno o más residuos de cisteína que no son necesarios para la función. Las variantes pueden diseñarse de manera que retengan o tengan una actividad biológica aumentada de una región particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional, residuos de aminoácidos catalíticos, etc.). Las variantes también incluyen fragmentos de los polipéptidos que se describen en la presente memoria, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos que corresponden a dominios funcionales. Se conocen técnicas de mutagénesis in vitro de genes clonados. También se incluyen polipéptidos que han sido modificados usando técnicas de biología molecular habituales, con el propósito de mejorar su resistencia a la degradación proteolítica u optimizar sus propiedades de solubilidad o hacerlos más apropiados como un agente terapéutico.
 45

Los anticuerpos quiméricos pueden prepararse por medios recombinantes, mediante la combinación de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada (V_L y V_H), obtenidas a partir de células productoras de anticuerpos de una especie, con las regiones constantes la cadena ligera y de la cadena pesada de otra. Típicamente, los anticuerpos quiméricos utilizan regiones variables de roedores o de conejos y regiones constantes humanas, con el fin de producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de dichos anticuerpos quiméricos es bien conocida en la técnica, y puede conseguirse por medios estándar (tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. No. 5.624.659). También se contempla que las regiones constantes humanas de los anticuerpos quiméricos pueden seleccionarse de las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
 55

Los anticuerpos humanizados pueden prepararse por ingeniería para contener dominios de inmunoglobulina incluso más similares a los humanos, e incorporar tan solo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de animal. Esto puede conseguirse examinando cuidadosamente la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal y adaptándolos a la estructura de las cadenas del anticuerpo humano. Aunque podría parecer complejo, el proceso es bastante directo en la práctica. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. No. 6.187.287. En la Patente de los EE. UU. No. 7.935.340 expedida se describen métodos para humanizar los anticuerpos. En algunos casos, puede ser necesario determinar si se requieren residuos marco adicionales de conejo para mantener la actividad. En algunos casos, los anticuerpos humanizados todavía requieren retener algunos residuos marco críticos de conejo para minimizar las pérdidas en la afinidad o en la actividad. En estos casos, es necesario cambiar uno o más aminoácidos marco de las secuencias de la línea germinal humana de nuevo por los aminoácidos originales del conejo, con el fin de tener la actividad deseada. Estos cambios se determinan experimentalmente para identificar qué residuos de conejo son necesarios para conservar la afinidad y la actividad.

Además de las inmunoglobulinas completas (o sus contrapartes recombinantes), pueden sintetizarse fragmentos de inmunoglobulinas que comprenden el sitio de unión al epítipo (por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂ u otros). Un "fragmento" o una inmunoglobulina mínima pueden diseñarse utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinantes. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" pueden producirse sintetizando una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada fusionadas. Las combinaciones de anticuerpos también son de interés, por ejemplo, los diacuerpos, que comprenden dos especificidades de Fv diferentes. En otro ejemplo, las SMIP (moléculas pequeñas inmunofarmacéuticas), los anticuerpos de camello, los nanocuerpos y los IgNAR están englobados por fragmentos de inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas y los fragmentos de las mismas pueden modificarse después de la traducción, por ejemplo, para añadir restos efectores, tales como conectores químicos, restos detectables, tales como colorantes fluorescentes, enzimas, toxinas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, restos quimioluminiscentes y semejantes, o restos de unión específica, tales como estreptavidina, avidina, biotina y semejantes, pueden utilizarse en los métodos y las composiciones de la presente invención. Más adelante se proporcionan ejemplos de moléculas efectoras adicionales.

Variante asociada al producto: un producto que es diferente del producto deseado (por ejemplo, el complejo con múltiples subunidades deseado), que está presente en una preparación del producto deseado y está relacionado con el producto deseado. Las variantes asociadas al producto ejemplares incluyen péptidos truncados o alargados, productos que presentan una glicosilación diferente de la glicosilación deseada (por ejemplo, si se desea obtener un producto aglicosilado, se considera que cualquier producto glicosilados es una variante asociada al producto), complejos que presentan una estequiometría anormal, ensamblaje inapropiado, enlaces disulfuro anormales, plegamiento anormal o incompleto, agregación, escisión por proteasa u otras anomalías. Las variantes asociadas al producto ejemplares pueden presentar alteraciones en uno o más de masa molecular (por ejemplo, detectada por cromatografía de exclusión por tamaño), punto isoeléctrico (por ejemplo, detectado por enfoque isoeléctrico), movilidad electroforética (por ejemplo, detectada por electroforesis en gel), estado de fosforilación (por ejemplo, detectado por espectrometría de masa), relación entre la carga y la masa (por ejemplo, detectada por espectrometría de masa), masa o la identidad de los fragmentos proteolíticos (por ejemplo, detectada por espectrometría de masa o electroforesis en gel), hidrofobicidad (por ejemplo, detectada por HPLC), carga (por ejemplo, detectada por cromatografía de intercambio iónico), afinidad (por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, detectada por unión a la proteína A, a la proteína G y/o un epítipo al que se une el anticuerpo deseado) y estado de glicosilación (por ejemplo, detectado por afinidad de unión a lectina). Cuando la proteína deseada es un anticuerpo, el término variante asociada al producto puede incluir una variante con cadena pesada glicosilada y/o una especie de medio anticuerpo (que se describirán más adelante).

Las variantes asociadas al producto ejemplares incluyen las variantes que contienen enlaces disulfuro aberrantes. Por ejemplo, la mayoría de las moléculas de anticuerpo IgG1 se estabilizan por un total de 16 enlaces disulfuro intracadena e intercadena, que estabilizan el plegamiento de los dominios de la IgG en la cadena pesada y en la cadena ligera, mientras que los enlaces disulfuro intercadena estabilizan la asociación entre la cadena pesada y la cadena ligera. Otros tipos de anticuerpos contienen asimismo enlaces disulfuro intercadena e intracadena estabilizantes característicos. Además, algunos anticuerpos (que incluyen Ab-A y Ab-B que se describen en la presente memoria) contienen enlaces disulfuro adicionales referidos como enlaces disulfuro no canónicos. Por lo tanto, los enlaces disulfuro intercadena aberrantes pueden dar como resultado un complejo con una estequiometría anormal, debido a la ausencia de un enlace covalente estabilizante y/o enlaces disulfuro con subunidades adicionales. Adicionalmente, los enlaces disulfuro aberrantes (ya sean intercadena o intracadena) pueden disminuir la estabilidad estructural del anticuerpo, lo que puede provocar una actividad disminuida, estabilidad disminuida, propensión incrementada a formar agregados y/o inmunogenicidad incrementada. Las variantes asociadas al producto que contienen enlaces disulfuro aberrantes pueden detectarse de diversas maneras, que incluyen la SDS-PAGE desnaturante no reductora, electroforesis capilar, cIEX, espectrometría de masa (opcionalmente con modificación química para producir un desplazamiento de masa en las cisteínas libres), cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC, cambios en la dispersión de la luz y cualquier otro

método apropiado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, The Protein Protocols Handbook, 2002, Parte V, 581-583, DOI: 10.1385/1-59259-169-8:581.

5 Medio anticuerpo, especie de medio anticuerpo, o H1L1 hacen referencia a un complejo de proteínas que incluye una única cadena pesada y una única cadena ligera de anticuerpo, pero que carece de una unión covalente a una segunda
 10 cadena pesada y una segunda cadena ligera de anticuerpo. Dos medios anticuerpos pueden permanecer asociados no covalentemente bajo determinadas condiciones, pero pueden separarse bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, detergente, sal, o temperatura) para facilitar su detección separados de los anticuerpos H2L2 completos. De manera similar, el término H2L1 hace referencia a un complejo de proteínas que incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo y una única cadena ligera de anticuerpo, pero que carece de una segunda unión covalente a una segunda cadena ligera
 15 de anticuerpo; estos complejos también pueden asociarse no covalentemente con otra cadena ligera de anticuerpo (y asimismo proporcionar un comportamiento similar al de un anticuerpo completo). Al igual que los anticuerpos completos, las especies de medios anticuerpos y las especies de H2L1 pueden disociarse bajo condiciones reductoras en cadenas pesadas y cadenas ligeras individuales. Las especies de medios anticuerpos y las especies de H2L1 pueden detectarse en un gel de SDS-PAGE no reductor como una especie que migra con un peso molecular aparente menor que el del anticuerpo completo, por ejemplo, H1L1 migra con un peso molecular aparente que es aproximadamente la mitad del del anticuerpo completo, (por ejemplo, aproximadamente 75 kDa).

20 Variante de cadena pesada glicosilada hace referencia a una variante glicosilada asociada al producto que en ocasiones está presente en preparaciones de anticuerpos y que contiene al menos una secuencia Fc parcial. La variante de cadena pesada glicosilada se caracteriza por una movilidad electroforética reducida que puede observarse por SDS-PAGE (en comparación con una cadena pesada normal), afinidad de unión a lecitina, unión a un anticuerpo anti-Fc y peso molecular aparente mayor de los complejos de anticuerpo que contienen la variante de cadena pesada glicosilada como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño. Véase la Solicitud Provisional de los EE. UU. No. de Ser. 61/525.307 (Documento de Abogado No. 67858.730200), presentada el 31 de agosto de 2011.

25 La expresión "levadura poliploide que expresa de manera estable o expresa un polipéptido heterólogo secretado deseado durante un tiempo prolongado" hace referencia a un cultivo de levaduras que secreta dicho polipéptido durante al menos varios días a una semana, más preferiblemente al menos un mes, aún más preferiblemente al menos 1-6 meses, y aún más preferiblemente durante más de un año niveles de expresión umbrales, típicamente al menos 50-500 mg/litro (después de aproximadamente 90 horas en el cultivo), y preferiblemente sustancialmente mayor.

30 La expresión "cultivo de levadura poliploide que secreta cantidades deseadas de un polipéptido recombinante" hace referencia a cultivos que secretan de manera estable o durante períodos prolongados al menos al menos 50-500 mg/litro, y más preferiblemente 500-1.000 mg/litro o más.

35 Una secuencia de polinucleótidos "corresponde" a una secuencia de polipéptidos si la traducción de la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con el código genético rinde la secuencia de polipéptidos (es decir, la secuencia de polinucleótidos "codifica" la secuencia de polipéptidos). Una secuencia de polinucleótidos "corresponde" a otra secuencia de polinucleótidos si las dos secuencias codifican la misma secuencia de polipéptidos.

40 Una región o un dominio "heterólogo" de una construcción de ADN es un segmento de ADN que se puede identificar en una molécula de ADN más grande, que no están asociados a la molécula más grande en la naturaleza. Por consiguiente, cuando la región heteróloga codifica un gen de un mamífero, el gen frecuentemente está flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de una región heteróloga es una construcción donde la propia secuencia codificadora no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc donde la secuencia codificadora genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes de los del gen nativo). Las variaciones alélicas o los eventos de mutación naturales no dan lugar a una región de ADN heteróloga, tal como se la define en la presente memoria.

45 Una "secuencia codificadora" es una secuencia de codones en marco que (en vista del código genético) corresponde a o codifica una secuencia de proteína o de péptido. Dos secuencias codificadoras se corresponden entre sí si las secuencias o sus secuencias complementarias codifican las mismas secuencias de aminoácidos. Una secuencia codificadora asociada a las secuencias reguladoras apropiadas puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción frecuentemente se ubicarán 3' de la secuencia codificadora. Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN que puede unirse a la ARN
 50 polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de la secuencia codificadora aguas arriba (en dirección 3'). Las secuencias promotoras típicamente contienen sitios adicionales para la unión de las moléculas reguladoras (por ejemplo, factores de transcripción) que afectan la transcripción de la secuencia codificadora. Una secuencia codificadora se encuentra "bajo el control" de una secuencia promotora o está "ligada operativamente" al promotor cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora en una célula y transcribe la secuencia codificadora en ARNm, el cual a su vez es traducido en la proteína codificada por la secuencia codificadora.
 55

Se usan vectores para introducir una sustancia extraña, tal como ADN, ARN o proteína, en un organismo o en una célula huésped. Los vectores típicos incluyen los virus recombinantes (para los polinucleótidos) y los liposomas (para los polipéptidos). Un "vector de ADN" es un replicón, tal como un plásmido, un fago o un cósmido, al cual puede unirse otro segmento de polinucleótido, con el fin de efectuar la replicación del segmento unido. Un "vector de expresión" es un vector de ADN que contiene secuencias reguladoras que pueden dirigir la síntesis de los polipéptidos en una célula huésped apropiada. Esto significa habitualmente que un promotor se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del ARNm, así como sitios de unión en los ribosomas y señales de inicio para dirigir la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos. La incorporación de una secuencia de polinucleótidos en un vector de expresión, en el sitio apropiado y en el marco de lectura correcto, seguida por la transformación de la célula huésped apropiada con el vector, permite la producción de un polipéptido que codificado por dicha secuencia de polinucleótidos.

La "amplificación" de las secuencias de polinucleótidos es la producción in vitro de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico particular. La secuencia amplificada frecuentemente está en la forma de ADN. En los siguientes artículos de revisión, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad, se describe una variedad de técnicas para llevar a cabo dicha amplificación: Van Brunt (1990, *Bio/Technol.*, 8(4):291-294); y Gill y Ghaemi, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, marzo de 2008; 27(3):224-43. La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un prototipo de la amplificación de ácidos nucleicos, y el uso de la PCR en la presente memoria debe considerarse ejemplar de otras técnicas de amplificación apropiadas.

No se comprende bien la estructura general de los anticuerpos de la mayoría de los vertebrados (incluidos los mamíferos (Edelman, G. M., *Ann. NY Acad. Sci.*, 190:5 (1971)). Los anticuerpos convencionales consisten en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas con un peso molecular aproximado de 23.000 daltons (la "cadena ligera"), y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 53.000-70.000 (la "cadena pesada"). Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras rodean a las cadenas pesadas a partir de la boca de la configuración en "Y". La porción de la "rama" de la configuración en "Y" se conoce como la región F_{ab} ; la porción de tallo de la configuración en "Y" se conoce como la región F_c . La orientación de la secuencia de aminoácidos se extiende desde el extremo N en la parte superior de la configuración en "Y" hasta el extremo C-terminal en la base de cada cadena. El extremo N-terminal posee la región variable que presenta especificidad por el antígeno que la genera, y su longitud es de aproximadamente 100 aminoácidos, aunque puede haber variaciones ligeras entre la cadena ligera y cadena pesada y entre anticuerpos.

La región variable está unida en cada cadena a una región constante, que se extiende a lo largo del resto de la cadena y que, dentro de una clase de anticuerpo en particular, no varía con la especificidad del anticuerpo (es decir, en función del antígeno que lo genera). Hay cinco clases principales conocidas de regiones constantes que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que corresponden a las regiones constantes de cadena pesada gamma, mu, alfa, delta y épsilon). La región constante o la clase determinan la función efectora subsiguiente del anticuerpo, incluyendo la activación del complemento (Kabat, E. A., *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, 2ª Ed., páginas 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976)) y otras respuestas celulares (Andrews, D. W., et al., *Clinical Immunobiology*, páginas 1-18, W. B. Sanders (1980); Kohl, S., et al., *Immunology*, 48: 187 (1983)), mientras que la región variable determina el antígeno con el que tiene lugar la reacción. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Cada clase de cadena pesada puede emparejarse con cualquiera de las cadenas ligeras kappa o lambda. Las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de la "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí a través de enlaces covalentes disulfuro cuando las inmunoglobulinas se generan bien por hibridomas o por células B.

La expresión "región variable" o "VR" hace referencia a los dominios dentro de cada par de cadenas ligeras y pesadas en un anticuerpo que están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H), seguido por numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada.

Las expresiones "región determinante de la complementariedad", "región hipervariable" o "CDR" hacen referencia a una o más de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR) que están presentes en las regiones variables de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo (véase Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)). Estas expresiones incluyen las regiones hipervariables, que han sido definidas por Kabat et al. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Kabat E., et al., US Dept. of Health and Human Services, 1983) o los bucles hipervariables en las estructuras tridimensionales de los anticuerpos (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). Las CDR en cada cadena se mantienen próximas por regiones marco y, junto con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno. Dentro de las CDR, hay aminoácidos seleccionados que se han descrito como las regiones determinantes de la selectividad (SDR), que representan los residuos de contacto críticos usados por la CDR en la interacción anticuerpo-antígeno

(Kashmiri, S., Methods, 36:25-34 (2005)).

Las expresiones “región marco” o “FR” hacen referencia una o más de las regiones marco en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo (véase Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)). Estas expresiones incluyen aquellas regiones de las secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo.

La expresión “número de copias estable” hace referencia a una célula huésped que mantiene de forma sustancial el número de copias de un gen (tal como un gen de cadena de un anticuerpo) durante un período de tiempo prolongado (tal como al menos un día, al menos una semana, o al menos un mes o más) o durante un número prolongado de generaciones de propagación (por ejemplo, al menos 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500 o 1.000 generaciones, o más). Por ejemplo, en un punto de tiempo dado o número de generaciones, al menos el 50 %, y preferiblemente al menos el 70 %, 75 %, 85 %, 90 % o 95 % o más de las células en el cultivo, pueden mantener el mismo número de copias del gen que en la célula de partida. En un ejemplo preferido, la célula huésped contiene un número de copias estable del gen que codifica la proteína deseada o que codifica cada subunidad del complejo con múltiples subunidades deseado (por ejemplo, anticuerpo).

La expresión “expresa de forma estable” hace referencia a una célula huésped que mantiene niveles de expresión similares de un gen o de una proteína (tal como un anticuerpo) durante un período de tiempo prolongado (tal como al menos un día, al menos una semana, o al menos un mes o más) o durante un número prolongado de generaciones de propagación (por ejemplo, al menos 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500 o 1.000 generaciones, o más). Por ejemplo, en un punto de tiempo dado o número de generaciones, la tasa de producción o el rendimiento del gen o de la proteína pueden ser al menos un 50 %, y preferiblemente al menos un 70 %, 75 %, 85 %, 90 % o 95 % o más de la tasa de producción inicial, o más. En un ejemplo preferido, la célula huésped expresa de forma estable la proteína o el complejo con múltiples subunidades deseado (por ejemplo, anticuerpo).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una completa exposición y descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que es considerado como la invención. La invención se define por las reivindicaciones. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero se deben permitir algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, temperatura es en grados centígrados; y presión es atmosférica o cercana.

Ejemplo 1 - Ejemplo Comparativo

Los ejemplos 1 a 10 muestran la aplicabilidad del método para la producción de cuatro anticuerpos monoclonales humanizados diferentes. Cada anticuerpo es producido en *Pichia pastoris* usando el sistema promotor del gliceraldehído-3-fosfato (GAP).

Hemos encontrado una diferencia en las titulaciones entre los cultivos aeróbicos e hipóxicos del anticuerpo Mab2. La restricción de la disponibilidad del oxígeno para el cultivo por reducción de la tasa de agitación en el fermentador dio como resultado un aumento significativo en la formación del producto. Esta fue nuestra primera confirmación de que las condiciones hipóxicas, cuando se aplican a la producción de anticuerpos de longitud completa, dan como resultado un aumento significativo en la formación del producto para anticuerpos monoclonales humanizados con enlaces disulfuro apropiados completamente ensamblados. Véase la Fig. 37.

Ejemplo 2 - Ejemplo Comparativo

Se crecen tres cepas diferentes de anticuerpo Mab1, cada una con diferentes números de copias, en fermentadores de 20 litros usando la estrategia de control de RQ (modulación de la agitación usando control por retroalimentación que modula la velocidad del agitador para mantener el RQ en un nivel deseado (en este caso un valor de 1,12) para promover el metabolismo mixto de condiciones hipóxicas en un modo controlado para asegurar así que las concentraciones de etanol no alcancen niveles tóxicos. En cada caso, la naturaleza robusta del mecanismo de control por retroalimentación permite el metabolismo mixto sin acumulación de niveles tóxicos de etanol (típicamente mayor de 20 g/L). (Véanse las Fig. 1-5)

Ejemplo 3 - Ejemplo Comparativo

Se cultiva Mab1 bajo condición hipóxica usando la estrategia de control de RQ, a tres puntos de ajuste de control diferentes para RQ. En este caso, el aumento del punto de ajuste de RQ aumenta el nivel de acumulación de etanol,

reduce la acumulación de células, pero no tiene un impacto significativo en la acumulación total del producto. Esto muestra la utilidad del método de RQ para puntos de ajuste que varían de 1,09 a 1,35. (Véanse las Fig. 6-10).

Ejemplo 4 - Ejemplo Comparativo

5 Comparamos, para Mab1, el efecto del crecimiento hipóxico, logrado por el control de RQ, frente al mismo proceso bajo condiciones aeróbicas. El proceso aeróbico da como resultado una menor producción de etanol (como era esperado) y una formación de producto marcadamente menor. (Véanse las Fig. 11-16).

Ejemplo 5 - Ejemplo Comparativo

10 La estrategia de control de RQ se implementó en las fermentaciones de Mab2 que tuvieron cepas de producción que variaban en el número de copias de cada cadena pesada y ligera. Este estudio muestra la naturaleza robusta de la estrategia de RQ en el control de la acumulación de etanol a la vez que proporciona un ambiente hipóxico para el metabolismo mixto. (Véanse las Fig. 17-21).

Ejemplo 6 - Ejemplo Comparativo

15 La estrategia de control de RQ se implementó en las fermentaciones de Mab3 que tuvieron cepas de producción que variaban en el número de copias de cada cadena pesada y ligera. Este estudio muestra la naturaleza robusta de la estrategia de RQ en el control de la acumulación de etanol a la vez que proporciona un ambiente hipóxico para el metabolismo mixto. (Véanse las Fig. 22-26)

Ejemplo 7 - Ejemplo Comparativo

20 Las cepas de Mab3, que contienen copias variadas de la cadena pesada y de la cadena ligera se crecen usando la estrategia de control de RQ pero incorporando tasas de alimentación de glucosa variadas. Nuevamente, la estrategia de RQ permite el control efectivo de los niveles de etanol, dando como resultado tasas de acumulación de producto muy similares. Esto proporciona una evidencia adicional de la robustez de la estrategia de RQ para una variedad de condiciones de fermentación. (Véanse las Fig. 27-31).

Ejemplo 8 - Ejemplo Comparativo

25 La estrategia de RQ se demuestra para MAb4, el cual se une a la misma diana que MAb1, pero tiene una secuencia diferente en su CDR respecto a MAb1. Comparamos dos tasas diferentes de alimentación de glucosa. Una vez más la estrategia permitió una concentración estable de etanol y tasas similares de acumulación de anticuerpo. (Véanse las Fig. 32-36).

Ejemplo 9 - Ejemplo Comparativo

30 Este ejemplo describe el proceso de fermentación para la producción de medios de fermentación para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

El medio del inóculo se describe a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Medio del inóculo

Componente*	Concentración final
Extracto de levadura	30 g/l
KH ₂ PO ₄	27,2 g/l
Glicerol o Glucosa	20 g/l
Base de levadura nitrogenada sin aminoácidos	13,4 g/l
Biotina	0,4 mg/l

35 *Manteniendo la misma molaridad, cualquier químico (X nH₂O; n≥0) puede reemplazarse por otro químico que contenga el mismo ingrediente activado pero diferente cantidad de agua (X kH₂O; k ≠ n).

Medio de Fermentación de siembra

El medio se describe a continuación en la Tabla 2.

Composición del medio de fermentación de siembra

Componente*	Concentración final
Citrato de sodio dihidrato	10,0 g/l
MgSO ₄ -7H ₂ O	3,7 g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	36,4 g/l
K ₂ HPO ₄	12,8 g/l
K ₂ SO ₄	18,2 g/l
Glicerol, anhidro	40,0 g/l
Extracto de levadura	30,0 g/l
Antiespumante 204	0,5 ml/l
Disolución de minerales traza (PTM1)	4,35 ml/l

- 5 *Manteniendo la misma molaridad, cualquier químico (X nH₂O; n≥0) puede reemplazarse por otro químico que contenga el mismo ingrediente activado pero diferente cantidad de agua (X kH₂O; k ≠ n).

La disolución de minerales traza se describe a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Disolución de minerales traza (PTM1)

Componente*	Concentración final
ZnCl ₂ ·7H ₂ O o sulfato de cinc heptahidrato	20 g/l ¹ o 35g/l ²
FeSO ₄ -7H ₂ O	65 g/l
H ₂ SO ₄ al 95-98 %	5 ml/l
NaI	0,08 g/l
MnSO ₄ -2H ₂ O	3 g/l
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,2 g/l
H ₃ BO ₃	0,02 g/l
CoCl ₂	0,5 g/l
CuSO ₄ -5H ₂ O	6 g/l
Biotina	0,2 g/l

- 10 *Manteniendo la misma molaridad, cualquier químico (X nH₂O; n≥0) puede reemplazarse por otro químico que contenga el mismo ingrediente activado pero diferente cantidad de agua (X kH₂O; k≠n).

Cuando todos los componentes están completamente disueltos en agua DI, se esteriliza con filtro a través de un filtro estéril de 0,2 µm.

El medio discontinuo del cultivo de producción se describe a continuación en la Tabla 4

Tabla 4. Medio discontinuo del cultivo de producción

Componente*	Concentración final
Citrato de sodio dihidrato	10,0 g/l
MgSO4-7H2O	3,7 g/l
NH4H2PO4	35,6 g/l
K2HPO4	12,8 g/l
K2SO4	18,2 g/l
Glicerol, anhidro	40,0 g/l
Extracto de levadura	30,0 g/l
Antiespumante 204	1,6 ml/l

5

*Manteniendo la misma molaridad, cualquier químico (X nH₂O; n≥0) puede reemplazarse por otro químico que contenga el mismo ingrediente activado pero diferente cantidad de agua (X kH₂O; k≠n).

10 Lo anterior se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante un mínimo de 20 minutos. Después de la esterilización y enfriamiento, se añaden 4,35 ml/l de disolución de minerales traza (PTM1) al medio discontinuo del cultivo de producción. Antes de la inoculación del fermentador, el medio discontinuo del cultivo de producción que contiene 4,35 ml/l de PTM1 debe ajustarse a un pH de 6,0 con NH₄OH al 24-30 %. Los valores anteriores deben basarse en el volumen total al inicio de la fermentación, que incluye tanto el medio como el cultivo de inóculo.

La disolución de alimentación de glucosa/extracto de levadura se describe a continuación en la Tabla 5.

Componente*	Concentración final
Dextrosa, anhidra	500 g/l
Extracto de levadura	50 g/l
MgSO4-7H2O	3 g/l
Antiespumante 204	0,1 ml/l
Citrato de sodio dihidrato	1,66 g/l
PTM1	12 ml/l

15 *Manteniendo la misma molaridad, cualquier químico (X nH₂O; n≥0) puede reemplazarse por otro químico que contenga el mismo ingrediente activado pero diferente cantidad de agua (X kH₂O; k≠n).

La composición del bolo de etanol se describe a continuación en la Tabla 6.

Componente*	Concentración final
Etanol, 200 grados prueba	11 g/l

*Opcionalmente, puede usarse una disolución más diluida de etanol para lograr la misma concentración final.

Proceso de fermentación

- 5 El proceso de fermentación para la producción de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se realiza por levaduras, tal como *P. pastoris*. La fermentación se inicia a partir de la descongelación de un vial congelado de un banco de células de trabajo. Las células descongeladas se propagan entonces en matraces de agitación. El cultivo del matraz de agitación se usa entonces en la etapa de inóculo, seguido por un proceso de alimentación discontinua para la producción de anticuerpo. Opcionalmente, el inóculo puede usarse para propagar células en una fermentación de siembra discontinua, que puede usarse entonces para inocular el fermentador de producción.

1. Etapa de inóculo

- 15 Las células descongeladas del banco de células de trabajo son transferidas a un matraz de agitación con deflectores (1 y 4 deflectores) que contienen un 8-20 % de la capacidad del volumen de trabajo del matraz con medio para inóculo. El banco de células de trabajo descongeladas se añade a un 0,1-1,0 % del volumen del medio de inóculo al matraz de agitación. El cultivo de inóculo se incuba a 29-31 °C a una velocidad de agitación de 220-260 rpm. El cultivo de siembra se recolecta una vez que alcanza una densidad celular correlacionada con la absorbancia a 600 nm (DO_{600}) de 15-30 (óptimamente, 20-30). El tiempo de cultivo usualmente es 20-26 horas (óptimamente, 23-25 horas).

2. Fermentación de siembra Fermentación discontinua (Opcional)

El fermentador se inocula con inóculo de la "Etapa de inóculo"

- 20 Inóculo = 0,3 % del volumen de medio del fermentador de siembra

Temp: 30 °C

% DO: 30 %

pH: 6,0

Agitación: estrategia de cascada de 100-490 RPM

- 25 Flujo de aire: 1 vvm ((volumen de aire/volumen de medio del fermentador de partida)/minuto)

Presión: 0,2 bares

La suplementación con oxígeno ocurrirá cuando se alcance la agitación máxima con una correspondiente disminución en el flujo de aire para mantener un vvm constante, para mantener el punto de ajuste de % de DO deseado del 30 %

Monitorización continua para pico de DO.

- 30 Cuando se produce un pico de DO que se indica por una disminución en la agitación y un aumento en DO, denotando que la fuente de carbono (glicerol o glucosa) ha sido completamente utilizada y la densidad óptica medida, DO_{600} , es mayor de 20, se transfiere un volumen de la fermentación discontinua de siembra o cultivo de inóculo que es igual al 1,0-10 % del volumen del lote de partida del fermentador de producción.

3. Fase de cultivo discontinuo

- 35 El cultivo discontinuo se inicia por la inoculación del fermentador con el cultivo de siembra y se termina con la depleción del glicerol. El fermentador contiene medio de lote de cultivo de producción preparado al 30-40 % del volumen de trabajo máximo. El cultivo de siembra se usa para crear un inóculo al 1-10 % en el fermentador. Los parámetros iniciales de diseño se ajustan como sigue:

Temperatura: 27-29 °C;

Agitación (P/V): 2-16 KW/m³

Presión de espacio cabeza: 0,7-0,9 Bares

Flujo de aire: 0,9-1,4 VVM (volúmenes de aire por volumen de cultivo por minuto, en base al volumen de partida)

DO: sin control

5 pH: 5,9 a 6,1, controlado por NH₄OH al 24-30 %

10 La velocidad de agitación inicial y el flujo de aire se mantienen constantes durante la fase de cultivo discontinuo con el objetivo de cumplir los requerimientos de poder inicial por volumen (P/V) y volumen por volumen por minuto (VVM). La fase de cultivo discontinuo se termina por el inicio de la alimentación cuando se depleciona el glicerol. La depleción del glicerol se indica por el pico del valor del oxígeno disuelto (DO). El pico de DO se define como cuando el valor de DO aumenta en más del 30 % en unos pocos minutos. La fase de cultivo discontinuo usualmente dura 10-15 horas (óptimamente, 11-13 horas).

4. Adición de un bolo de etanol (opcional)

Después de la observación del pico de DO como se mencionó anteriormente, se añaden 8-16 g/l de etanol, 200 grados prueba como un bolo en el fermentador. Esto generalmente se realiza a las 12-14 horas de la fase de cultivo discontinuo.

15 5. Fase de cultivo con alimentación discontinua

20 La alimentación en el fermentador con disolución de alimentación de glucosa/extracto de levadura se inicia después del pico de DO y después de la adición del bolo de etanol, alrededor de 12-14 horas en la fase de cultivo discontinuo y continúa hasta el final de la fermentación. La tasa de alimentación de disolución de alimentación de glucosa/extracto de levadura se ajusta para permitir 6-11 g de glucosa/l de volumen de partida por hora. El inicio de la disolución de alimentación de glucosa/extracto de levadura comienza la fase de cultivo con alimentación discontinua.

6. Inicio del control de RQ

25 El control del coeficiente respiratorio (RQ) comienza 8 después del inicio de la fase de cultivo con alimentación discontinua. Los puntos de ajuste de RQ iniciales están en el rango de 1,09-1,35. La agitación se usa para controlar el RQ. La agitación se bajó escalonada del punto de ajuste del control de RQ. El control de RQ comienza a aproximadamente 20-22 horas desde el inicio de la fase de cultivo discontinuo y continúa hasta el final de la fermentación. La duración del control de RQ dura aproximadamente 60 a 90 horas.

La agitación se ajusta con el objetivo de mantener un nivel ajustado de RQ. La estrategia de control de RQ se detalla a continuación:

Punto de ajuste alto del control de RQ: 1,35

30 Punto de ajuste bajo del control de RQ: 1,08

Punto de ajuste máximo del agitador: 255-950 rpm

Punto de ajuste mínimo del agitador: 150-300 rpm

Cambio en etapas del agitador (cambio a cada intervalo de tiempo de espera): 3-25 rpm

Tiempo de espera (tiempo entre evaluaciones): 3-10 minutos

35 Estrategia de control de etanol/RQ

Esta estrategia ha sido incorporada para asegurar que la concentración de etanol no exceda un valor máximo que puede ser tóxico para las células y no exceda un valor mínimo que podría reducir la expresión del producto.

Ejemplo 10 - Ejemplo comparativo

40 La Fig. 38 muestra los geles de SDS-PAGE de Mab1 producidos bajo condiciones hipóxicas y aeróbicas. Para el gel en condiciones no reductoras, además de la banda principal a 150 kDa, las bandas adicionales por debajo de la banda principal indican heterogeneidad del producto con respecto al nivel de puentes disulfuro intercadenas. Estos geles muestran que el nivel de heterogeneidad se reduce con el uso de condiciones hipóxicas. La homogeneidad aumentada de los productos completamente entrecruzados, de longitud completa, indica pureza aumentada, es decir, producto

deseado aumentado en relación a otras proteínas presentes.

La Fig. 38 también muestra el gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras para las mismas muestras. En este caso, las bandas esperadas a 25 kDa y 50 kDa representan las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Las bandas adicionales, particularmente la que está por encima de la cadena pesada a aproximadamente 55 kDa representa la presencia de especies variantes del anticuerpo. Estos geles muestran una reducción dramática de la presencia de esta variante cuando las células se crecen bajo condiciones hipóxicas, en comparación con el cultivo aeróbico.

Ejemplo 11

Este ejemplo ensaya el efecto de un cambio de temperatura sobre el rendimiento y la pureza de anticuerpos expresados por *P. pastoris*. El rendimiento del anticuerpo aumentó en hasta aproximadamente un 30 % por un cambio de temperatura hacia arriba realizado durante el cultivo. Adicionalmente, la pureza aumentó por el cambio de temperatura, como lo indica una disminución en la abundancia de variantes asociadas al producto y complejos aberrantes.

Métodos

Se expresó Ab-A a partir de una cepa de *P. pastoris* que contenía 4 copias integradas del gen de la cadena pesada y 3 copias integradas del gen de la cadena ligera (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente). Se expandió un inóculo usando un medio que comprendía los siguientes nutrientes (% p/v): extracto de levadura 3 %, glicerol 2 %, YNB 1,34 %, Biotina 0,004 % y 27,2 g/l de fosfato de potasio monobásico. Para generar el inóculo para los fermentadores, las células se crecieron durante aproximadamente 24-28 horas en un incubador con agitación a 30 °C y 300 rpm.

Las secuencias de Ab-A son como sigue:

Secuencia de polinucleótido de la cadena pesada de Ab-A:
 gaggtgagctgtgagctctggggaggcctggccagcctggggggctccctgagactctctgtgcagctctggaatcgacctagtggtactactacatgaactgggtccg
 tcaggctccagggaagggtgagctgggctggagctcattggtatgaatgggtccacatactacgcgagctggcgaaaggccgattcaccatctccagagacaattcca
 agaccacgggtatctcaaatgaacagcctgagagctgaggacactgctgtgtatttctgtctagaggggacatctgggccaagggaccctctcaccgtctcgagcg
 cctccaccaaggcccatcggtctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggcacagcggccctgggctgctgcaaggactactccccgaaccgggtg
 acgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgctctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgcccctcagc
 agcttgggaccagcactacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaaggtggagcgcgagagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccca
 ccgtgccagcaccgaactcctgggggaccgtcagcttctctcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggaccctgaggtcaccatgctggtggtg
 gacgtgagccagcaagaccctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagcccggggaggagcagtagccagcagcgt
 accgtgtgtcagcgtcctcaccctctgaccagagctgctgaatggcaaggagtaacaagtgcaggctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacccat
 ctcaaaagccaaagggcagccccgagaaccaaggtgtacaccctgccccctccggggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctgcaaggc
 ttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctgactccgacggctcctctctctacag
 caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctc
 cgggtaaatga (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de polinucleótido de la cadena ligera de Ab-A:
 caagtgtgaccagctccatctccctgctctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaattgccaggccagtcagagtgttatcataacacctactcctggcctggtatcag
 cagaaaccagggaagtctcaagcaactgatctatgatcatccactctggcatctggggtccatctcgtttcagtgagcagtggtgacagattcactctcaccatc
 agcagcctgagcctgaagatgtgcaactattactgtctggcagttatgattgtactaatggtgattgttttctcgccggaggaaaccaaggtgaaatcaaacgtacggt
 ggctgcaccatctgtcttctctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgtgctgctgataactctatcccagagaggccaaagtacagtggtg
 aaggtgataacgccctccaatcggtgtaactccagagagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaag
 cagactacgagaacacaagctacgcctgcaagctcaccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcctcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO: 2)

Después, se añadió un inóculo al 10 % a recipientes de 17L de volumen de trabajo Applikon que contenían 6 L de medio de crecimiento estéril. El medio de crecimiento comprendía los siguientes nutrientes: sulfato de potasio 18,2 g/L, fosfato monobásico de amonio 35,6 g/L, fosfato dibásico de potasio 12,8 g/L, sulfato de magnesio heptahidrato 3,72 g/L, citrato de sodio dihidrato 10 g/L, glicerol 40 g/L, extracto de levadura 30 g/L, metales traza PTM1 4,35 ml/L y antiespumante 204 1,67 ml/L. La disolución de metales traza PTM1 comprendía los siguientes componentes: sulfato cúprico pentahidrato 6 g/L, yoduro de sodio 0,08 g/L, sulfato de manganeso hidrato 3 g/L, molibdato de sodio dihidrato 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 heptahidrato 65 g/L, biotina 0.2 g/L y ácido sulfúrico 5 ml/L. Los parámetros de control del proceso del biorreactor se ajustaron como sigue: agitación 950 rpm, flujo de aire 1,35 litros estándares por minuto, temperatura 28 °C y el pH se controló (a 6) usando hidróxido de amonio. No se proporcionó suplementación de oxígeno.

Los cultivos de fermentación se crecieron durante aproximadamente 12 a16 horas a 28° C hasta que se consumió el glicerol inicial, que se detectó por un rápido aumento en la concentración de oxígeno disuelto, referido como el pico de DO. Inmediatamente después de detectar el pico de DO, se añadió un bolo de 11 gramos de etanol al 100 % por litro de

- cultivo al reactor para obtener una concentración final de aproximadamente etanol al 1,1 % (p/v). Los cultivos de fermentación se dejaron equilibrar durante 20 minutos. La adición de la alimentación se inició entonces a una tasa constante de 11 g de glucosa/L/hora durante la duración de la fermentación. Aproximadamente 8 horas después de iniciar la adición de la alimentación, se inició el control de RQ usando control por retroalimentación de la agitación con una velocidad mínima de agitación de 500 rpm y una velocidad máxima de agitación de 950 rpm manteniendo de este modo el punto de ajuste de RQ de 1,12 durante el resto de la fermentación. La alimentación comprendía los siguientes componentes: extracto de levadura 50 g/L, dextrosa anhidra 500 g/L, sulfato de magnesio heptahidrato 3 g/L y metales traza PTM1 12 ml/L. Opcionalmente, también se añadió citrato de sodio dihidrato (1,66 g/L) a la alimentación. El pH de la alimentación fue 6,0.
- 5
- 10 Cinco minutos luego de iniciar la alimentación, la temperatura del cultivo se cambió rápidamente a una de cinco temperaturas diferentes (25° C, 29,5° C, 31° C, 32,5° C y 34° C). Adicionalmente, un cultivo control se mantuvo a 28° C, es decir, sin cambio de temperatura. El tiempo total de fermentación fue aproximadamente 86-87 horas.

- Las muestras se recolectaron de cada cultivo a lo largo de la fermentación y se determinaron las titulaciones de caldo de cultivo completo y se representaron en unidades arbitrarias que son consistentes entre las figuras en esta solicitud.
- 15 Adicionalmente, al final de la operación, se determinó la pureza del anticuerpo (después de la purificación con Proteína A) por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) realizada sobre muestras en condiciones reductoras y no reductoras usando un HPLC Agilent Serie 1200 (Santa Clara, CA) con instrumento de detección UV. Para la separación de la muestra, se usó una columna TSKgel GS3000SWx1 7,8x300 mM conectada con un TSKgel Guard SWx1 6x40 mM de Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA). Se usó fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 200 mM con pH 6,5 como fase móvil con una tasa de flujo de 0,5 ml/min en modo isocrático y se monitorizó la absorbancia en UV 215 nm. Antes de la inyección de las muestras, la columna se equilibró hasta obtener una línea basal estable. Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 1 mg/ml usando fase móvil y se inyectó un volumen de 30 µL. Para monitorizar el rendimiento de la columna, se usaron estándares de filtración en gel de BioRad (Hercules, CA).
- 20

Resultados

- 25 Se creció *P. pastoris* preparada por ingeniería para expresar Ab-A en cultivos mantenidos a 28° C durante una fase de crecimiento inicial con glicerol como fuente de carbono. Después del agotamiento del glicerol, se inició una alimentación continua de glucosa y la temperatura del cultivo se cambió rápidamente hacia arriba o hacia abajo hasta un nuevo punto de ajuste de temperatura entre 25° C y 34° C, que se mantuvo durante la duración del cultivo. Un cultivo se mantuvo a 28° C como control.
- 30 Para monitorizar la producción de anticuerpo, el medio de cultivo (en el que se secretó el anticuerpo debido a la inclusión de una señal de secreción) se muestreó periódicamente hasta el punto de tiempo final de 86-87 horas. Se determinó la titulación de anticuerpo en caldo de cultivo completo (unidades arbitrarias) y se muestra gráficamente para cada temperatura de cultivo en la Fig. 40. Como se representa, la mayor titulación final se alcanzó para el cultivo mantenido a 31° C. Inicialmente, se obtuvo una titulación ligeramente mayor para el cultivo mantenido a 32,5° C, sin embargo, la titulación del caldo de cultivo completo se niveló y comenzó a disminuir entre las 65-70 horas y la titulación final fue menor que la observada para el cultivo sin cambio. La segunda titulación final más alta se observó con el cultivo mantenido a 29,5° C. El cultivo que se cambió a 34° C y el cultivo que se bajó hasta 25° C produjeron ambas titulaciones menores que el cultivo mantenido a 28° C.
- 35

- Adicionalmente, se determinó la pureza del anticuerpo al final del cultivo (es decir, a 86-87 horas). Específicamente, el anticuerpo purificado con proteína A de cada cultivo se evaluó por cromatografía de exclusión (SEC) y por electroforesis en gel con tinción de Coomassie (Fig. 42-47), que se realizaron sobre muestras en condiciones reductoras y no reductoras. El análisis por SEC de las muestras en condiciones no reductoras detectó la abundancia relativa de complejos que tenían estequiometría aberrante, que incluyen una especie de "medio anticuerpo" de 75 kDa que contenía una única cadena pesada y una única cadena ligera y un complejo "HHL" que contenía dos cadenas pesadas y una única cadena ligera. El análisis por SEC de las muestras en condiciones reductoras detectó la abundancia relativa de cadenas pesadas y ligeras intactas, así como subunidades aberrantes que tenían un tiempo de elución de aproximadamente 9,8, 10,15 y 10,8 minutos (que se cree que corresponden a las formas glicosiladas de la cadena pesada del anticuerpo).
- 40
- 45

- Los resultados de SEC se resumen en la Fig. 41A-B. El análisis por SEC en condiciones no reductoras demostró que una proporción similar de la proteína total estaba contenida en el pico de anticuerpo principal para los cultivos sin cambio (es decir, mantenidos a 28° C) y los cultivos con cambio a 29,5° C y 31° C, con las tres condiciones manteniendo el 88-89 % de la proteína total dentro del pico de anticuerpo completo (Fig. 41A). Por lo tanto, respecto a los complejos mal ensamblados, el cambio hacia arriba a 29,5° C y 31° C no afectó adversamente la pureza. Adicionalmente, el análisis por SEC en condiciones reductoras demostró que, en comparación con el cultivo sin cambio, la proporción de proteína total contenida en los picos de la cadena pesada y ligera permaneció similar para el cultivo cambiado a 29,5° C y aumentó en
- 50
- 55

aproximadamente un 4 % para los cambios de temperatura mayores.

En base a esto, se concluye que los cambios hacia arriba de temperatura a 29,5° C o 31° C (es decir, 1,5° C y 3° C) aumentaron el rendimiento de anticuerpo final. Adicionalmente, la pureza aumentó en el cultivo cambiado a 31° C, mientras que la pureza no se afectó adversamente en el cultivo cambiado a 29,5° C.

5 **Ejemplo 12** - Ejemplo comparativo

Este ejemplo ensaya el efecto de un cambio de temperatura sobre el rendimiento y pureza de anticuerpos expresados de *P. pastoris*. Se ensayaron dos cepas diferentes, una cepa de menor y mayor producción. Para la cepa de mayor producción, el rendimiento de anticuerpo aumentó en aproximadamente un 28 % por un cambio hacia arriba en la temperatura efectuado durante el cultivo. En base a esto, se concluye que la producción a partir de de una cepa ya altamente optimizada se benefició sustancialmente por el cambio de temperatura. Adicionalmente, la pureza aumentó por el cambio de temperatura, como lo indica una disminución en la abundancia de variantes asociadas al producto en la mayoría de los casos.

Métodos

15 Se expresó Ab-B a partir de una cepa de *P. pastoris* que contenía 3 o 4 copias integradas del gen de la cadena pesada y 3 copias integradas del gen de la cadena ligera (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente). Se expandió un inóculo usando un medio que comprendía los siguientes nutrientes (% p/v): extracto de levadura 3 %, glicerol 2 %, YNB 1,34 %, Biotina 0,004 % y 27,2 g/l de fosfato de potasio monobásico. Para generar el inóculo para los fermentadores, las células se crecieron durante aproximadamente 24-28 horas en un incubador con agitación a 30 °C y 300 rpm.

Las secuencias de Ab-B son como sigue:

20 Secuencia del polinucleótido de la cadena pesada de Ab-B:
gaggtgcagctggtggagctggggaggcttgccagcctgggggctcctgagactctcctgagcctctggattctccctcagtaactactacgtgacctgggtccg
tcaggctccagggaaggggctggagtggtcgccatcatctatgtagtgatgaaaccgctacgctacccgctataggccgattcaccatctccagagacaattccaa
gaacaccctgtatctcaaatgaacagcctgagagctgaggacactgctgttattactgtgctagagatgatagtagtgactgggatgcaaagtcaactgtggggccaa
gggaccctgctaccgctcagagcgcctccaccaaggccatcggtctccccctggcaccctctccaagagcaccctctgggggacagcggccctgggtgctggt
25 caaggactactccccgaaccggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgctcagctcctcaggactctactccctcag
cagcgtggtgacctgcccctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtaatcacaagcccagcaacaccaagggtgacaagagaggtgagcccaaat
ctgtgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcactgaactcctgggggaccgtcgtctctctcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgga
cccctgaggtcacatgctggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggagggtgataatgccaagacaaagccgc
gggaggagcagtagcccaagcagctaccgtggtgagcgtcctcaccctgctgaccaggaactggtgctgcaatggcaaggatgcaagggtctccaaagcc
30 tccagccccatcgagaaaactatccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccggaggagatgaccaagaaccagg
tcagcctgacctgctggtcaaggtctatcccagcagcatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagcgggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctgg
actccgacggctctctctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgaggtctgcacaaccact
acacgcagaagagcctctcctgctccgggtaaa (SEQ ID NO: 3)

35 Secuencia del polinucleótido de la cadena ligera de Ab-B:
gctatccagatgaccagctccttccctcctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgcccaggccagtcagagcattaacaatgagttatctggtatcagcag
aaaccagggaagcccctaagctcctgctatagggcatcactctggcctcctgagcctcagcggcagtgatctgggacagactcactctcaccatc
agcagcctgagcctgatgattttgcaacttattactgccaacaggggtatagctgaggaacattgataatgcttggcggaggggaccaagggtgaaatcaacgtacggt
ggctgaccatctgctctcctcctccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctggtgctgctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
aaggtgataacgcccctcaactcgggtaactcccagagaggtgcacagagcaggaacagcagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaa
40 cagactacgagaaacaaagtctacgctgcaagtcaccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg (SEQ ID NO: 4)

Después, se añadió un inóculo al 10 % a recipientes de 17L de volumen de trabajo Applikon que contenían 6 L de medio de crecimiento estéril. El medio de crecimiento comprendía los siguientes nutrientes: sulfato de potasio 18,2 g/L, fosfato monobásico de amonio 35,6 g/L, fosfato dibásico de potasio 12,8 g/L, sulfato de magnesio heptahidrato 3,72 g/L, citrato de sodio dihidrato 10 g/L, glicerol 40 g/L, extracto de levadura 30 g/L, metales traza PTM1 4,35 ml/L y antiespumante 204 1,67 ml/L. La disolución de metales traza PTM1 comprendía los siguientes componentes: sulfato cúprico pentahidrato 6 g/L, yoduro de sodio 0,08 g/L, sulfato de manganeso hidrato 3 g/L, molibdato de sodio dihidrato 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 heptahidrato 65 g/L, biotina 0.2 g/L y ácido sulfúrico 5 ml/L. Los parámetros de control del proceso del biorreactor fueron ajustados como sigue: agitación 950 rpm, flujo de aire 1,35 litros estándares por minuto, temperatura 28 °C y el pH se controló (a 6) usando hidróxido de amonio. No se proporcionó suplementación de oxígeno.

Los cultivos de fermentación se crecieron durante aproximadamente 12 a 16 horas a 28° C hasta que se consumió el glicerol inicial, que se detectó por un rápido aumento en la concentración de oxígeno disuelto, referido como el pico de DO. La adición de la alimentación se inició entonces a una tasa de 15 g de glucosa/l/hora durante 8 horas.

Aproximadamente 8 horas después de que se inició la adición de la alimentación, la tasa de adición de la alimentación se disminuyó a 13 g de glucosa//hora durante la duración de la fermentación. Además, se inició el control de RQ en este momento usando el control por retroalimentación de la agitación con una agitación mínima de 500 rpm y una agitación máxima de 950 rpm para mantener un punto de ajuste de RQ de 1,12. La alimentación estaba comprendida por los siguientes componentes: extracto de levadura 50 g/L, dextrosa anhidra 500 g/L, sulfato de magnesio heptahidrato 3 g/L y metales traza PTM1 12 ml/L. Opcionalmente, también se añadió citrato de sodio dihidrato (1,66 g/L) a la alimentación.

Después del inicio de la alimentación, la temperatura del cultivo se cambió rápidamente a 30° C para un cultivo de cada una de las dos cepas de expresión. Adicionalmente, para los dos cultivos de cada una de las dos cepas, los cultivos control se mantuvieron a 28° C, es decir, sin cambio de temperatura. El tiempo total de fermentación fue aproximadamente 86 horas.

Las muestras se recolectaron de cada cultivo a lo largo de la fermentación y se determinaron las titulaciones de caldo de cultivo completo y se representaron en unidades arbitrarias que son consistentes entre las figuras en esta solicitud. Adicionalmente, al final de la operación, se determinó la pureza del anticuerpo (después de purificación con Proteína A) por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) usando los métodos descritos en Ejemplo 11.

15 Resultados

Se expresó Ab-B a partir de cepas de *P. pastoris* preparadas por ingeniería que contenían 3 copias del gen que codifica la cadena ligera y 3 copias del gen que codifica la cadena pesada (H3/L3) o 3 copias del gen que codifica la cadena ligera y 4 copias del gen que codifica la cadena pesada (H4/L3). Los cultivos se crecieron inicialmente a 28° C con glicerol como una fuente de carbono. Después del agotamiento del glicerol, se inició una alimentación continua de glucosa y la temperatura del cultivo se cambió hacia arriba rápidamente a 30° C que se mantuvo durante la duración del cultivo, o se mantuvo a 28° C como control.

En la línea base, la cepa H4/L3 (Fig. 48A) expresó una mayor titulación de anticuerpo que la cepa H3/L3 (Fig. 48B), con la titulación final promedio del caldo de cultivo completo para los cultivos sin cambio (es decir, mantenidos a 28° C) siendo un 12 % mayor para la cepa H4/L3.

El cultivo H4/L3 cambiado a 30° C, exhibió un aumento adicional del 28 % en la titulación final (en relación con la titulación promedio de los dos cultivos H4/L3 mantenidos a 28° C, es decir, sin un cambio). Para las cepas H3/L3, el aumento observado en el rendimiento final fue un poco menos pronunciado, sin embargo, el rendimiento de la cepa H3/L3 cambiada a 30° C aumentó en aproximadamente un 5 % en relación al rendimiento final promedio de los dos cultivos H3/L3 mantenidos a 28° C (es decir, sin un cambio).

La Fig. 52 muestra la temperatura de cada cultivo representada frente al tiempo en el cultivo. Como se esperaba, después del cambio de temperatura, las células alcanzaron rápidamente el nuevo punto de ajuste de la temperatura de 30° C y tanto los cultivos con cambio con los sin cambio mantuvieron sus puntos de ajuste de temperatura a lo largo del cultivo.

La pureza del anticuerpo también se evaluó a partir de cada cultivo usando SE-HPLC. Como se describió en el Ejemplo 11, las muestras en condiciones no reductoras permitieron la detección de abundancia de complejos aberrantes (el "medio-anticuerpo" de 75 kDa que contiene una cadena pesada y una ligera y el complejo HHL que contiene dos cadenas pesadas, pero solo una cadena ligera). La fracción de proteína contenida en el anticuerpo completo ("pico principal de IgG") aumentó para las dos muestras con cambio a 30° C en comparación con el promedio de sus respectivos controles sin cambio, que dieron como resultado una disminución en las especies de HL 75 kDa y en las especies de Prepico HHL en las muestras con cambio en relación con el promedio de las muestras sin cambio. Específicamente, para la muestra sin cambio H4/L3 la fracción promedio de proteína contenida en el pico de anticuerpo completo fue 74,39 %, en el Prepico HHL fue 4,26 % y el HL 75 kDa fue 12,65 %, en comparación a 83,44 %, 4,75 % y 6,15 % para la muestra con cambio H4/L3, respectivamente. Asimismo, para las muestras sin cambio H3/L3 la fracción promedio de proteína contenida en el pico del anticuerpo completo fue 82,80 %, en el Prepico HHL fue 5,31 % y el HL 75 kDa fue 4,76 %, en comparación con 91,63 %, 2,94 % y 1,44 %, respectivamente. En conclusión, el análisis por SEC en condiciones no reductoras demostró que el cambio de temperatura (1) aumentó la cantidad promedio de anticuerpo contenido en el pico de anticuerpo completo y (2) disminuyó la cantidad promedio de los complejos aberrantes en tres de los cuatro casos.

También como se describe en el Ejemplo 11, las muestras en condiciones reductoras permitieron la detección de la abundancia relativa de proteína contenida en las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, así como las variantes asociadas al producto que se observaron en tres picos de elución discretos. A diferencia de la disminución observada en los complejos aberrantes con el análisis en condiciones no reductoras, las muestras en condiciones reductoras no mostraron una mejora consistente en la cantidad de anticuerpo contenido en las cadenas pesada y ligera de longitud completa. En resumen, para las dos cepas, la abundancia relativa promedio de la cadena pesada aumentó

aproximadamente un 1-3 % en los cultivos con cambio en comparación con el promedio de los cultivos sin cambio y la abundancia relativa promedio de la cadena ligera no cambió o disminuyó aproximadamente un 0,9 % para las dos cepas.

Ejemplo 13

5 Este ejemplo ensaya el efecto de un cambio de temperatura sobre el rendimiento y pureza de anticuerpos expresados en *P. pastoris*. El rendimiento del anticuerpo aumentó un 47 % de promedio para un cambio hacia arriba en la temperatura realizado durante el cultivo.

Métodos

10 Se expresó Ab-A en una cepa de *P. pastoris* que contenía 4 copias integradas del gen de la cadena pesada y 3 copias integradas del gen de la cadena ligera como se describe en el Ejemplo 11, excepto que cinco cultivos se mantuvieron a 28° C (es decir, sin cambio) y cuatro cultivos se cambiaron a 30° C. Como en el Ejemplo 11, el cambio de temperatura se realizó, si se hizo, en un tiempo de cinco minutos después del comienzo de la alimentación. El tiempo total de fermentación fue aproximadamente 87 horas.

15 Usando el método descrito en el Ejemplo 11, las muestras se recolectaron de cada cultivo a lo largo de la fermentación y se determinaron las titulaciones de caldo de cultivo completo y se representaron en unidades arbitrarias que son consistentes entre las figuras en esta solicitud y se determinó la pureza del anticuerpo para cada cultivo al punto de tiempo final (después de la purificación con proteína A) por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) realizada en muestras en condiciones reductoras y no reductoras.

Resultados

20 Se creció *P. pastoris* preparada por ingeniería para expresar Ab-A en cultivos mantenidos a 28° C durante una fase de crecimiento inicial con glicerol como fuente de carbono. Después del agotamiento del glicerol, se inició una alimentación continua de glucosa y la temperatura del cultivo se aumentó rápidamente hasta un nuevo punto de ajuste de 28° C que se mantuvo durante la duración del cultivo (N=4). Cinco cultivos controles se mantuvieron a 28° C (es decir, sin cambio).

25 La titulación de anticuerpo en caldo de cultivo completo se determinó por muestreo periódico y se muestra gráficamente en la Fig. 50 (unidades arbitrarias). Como se representa, cada uno de los cuatro cultivos que se cambiaron a 30° C produjo una titulación final mayor que todos los cultivos sin cambio mantenidos a 28° C. De promedio, la titulación final fue un 47 % mayor para los cultivos con cambio que para los cultivos sin cambio.

30 Adicionalmente, la pureza se evaluó por SE-HLPC y se comparó para los cultivos con cambio y sin cambio. Las muestras en condiciones no reductoras revelaron un aumento de aproximadamente el 2 % en la cantidad relativa de proteína contenida en el pico principal de anticuerpo de promedio, con el prepico HHL estando reducido de promedio aproximadamente un 21 % y el pico HL 75kDa estando aumentado un 57 %. Las muestras en condiciones reductoras revelaron una mejora generalizada en pureza y disminución en la abundancia relativa promedio de los tres picos de impurezas. Específicamente, en relación con las muestras sin cambio, las muestras con cambio exhibieron una disminución del 26 % en el pico con RT 9,80, una disminución del 74 % en el pico con RT 10,16 y una disminución del 70 % en el pico con RT 10,80. En conclusión, el análisis por SEC en condiciones no reductoras demostró que el cambio de temperatura (1) aumentó la cantidad promedio de anticuerpo contenido en el pico de anticuerpo completo y (2) disminuyó la cantidad promedio de dos de tres complejos aberrantes. El análisis por SEC en condiciones reductoras reveló una gran disminución en la abundancia relativa de cada uno de los tres picos de impurezas detectados.

40 En base a esto, se concluye que un cambio de temperatura hacia arriba de 28° C a 30° C (es decir, en 2° C) aumenta reproduciblemente el rendimiento de anticuerpo final en un promedio del 25-30 %. Adicionalmente, la pureza de los anticuerpos como se refleja por el análisis por electroforesis capilar también reflejó un aumento en la pureza en los cultivos con cambio de temperatura en comparación con los cultivos sin cambio, aún más notable en las comparaciones en condiciones reductoras.

45 Determinadas enseñanzas relacionadas con los métodos para obtener una población clonal de células B específicas de antígeno se describieron en la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. No. 60/801.412, presentada el 19 de mayo de 2006 y en la Pub. de Solicitud de Patente de los EE. UU. No. 2012/0141982.

50 Determinadas enseñanzas relacionadas con la humanización de los anticuerpos monoclonales derivados de conejos y con las modificaciones de secuencias preferidas para mantener la afinidad de unión al antígeno se describieron en la Solicitud Internacional No. PCT/US2008/064421, que corresponde a la Publicación Internacional No. WO/2008/144757, titulada "Novel Rabbit Antibody Humanization Methods and Humanized Rabbit Antibodies", presentada el 21 de mayo de 2008.

Determinadas enseñanzas relacionadas con la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos usando el apareamiento de levaduras competentes, y los métodos correspondientes, se describieron en la Solicitud de Patente de los EE. UU. No. 11/429.053, presentada el 8 de mayo de, 2006 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE. UU. No. US2006/0270045).

5 Listado de secuencias

<110> ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC. Lesnicki, Gary McNeill, Patricia Dianne Hartner, Franz Young, Mark

10 <120> CAMBIO DE TEMPERATURA PARA UNA EXPRESIÓN CON MAYOR RENDIMIENTO DE POLIPÉPTIDOS EN LEVADURAS Y OTRAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

<130> 43257.3013

15 <141> 17-03-2014

<150> 61/791471

<151> 15-03-2013

20 <150> 61/790,613

<151> 15-03-2013

<160> 28

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1326

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia de anticuerpos diseñada genéticamente

<400> 1

gaggtgcagc ttgtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag tctctggaat cgacctcagt ggctactaca tgaactgggt ccgtcaggct	120
ccaggggaag ggctggagtg ggtcggagtc attggtatta atggtgccac atactacgcg	180
agctgggcga aaggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaccac ggtgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacact gctgtgtatt tctgtgctag aggggacatc	300
tggggccaag ggaccctcgt caccgtctcg agcgcctcca ccaagggccc atcggctctc	360
cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc	420
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc	480
gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg	540
accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaactgaa tcacaagccc	600
agcaacacca aggtggacgc gagagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	660
ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	720
ccaaggaaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	780
35 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	840

ES 2 749 751 T3

	gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac gccagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	900
	accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	960
	gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1020
	caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1080
	tgctgtgta aagccttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1140
	ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc	1200
	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1260
	gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1320
	aaatga	1326
	<210> 2	
	<211> 660	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia de anticuerpos diseñada genéticamente	
	<400> 2	
	caagtgtgta cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc	60
	aattgccagc ccagtcagag tgtttatcat aacacctacc tggcctggta tcagcagaaa	120
	ccagggaaaag ttcctaagca actgatctat gatgcatcca ctctggcatc tgggggccca	180
	tctcgtttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagcctgag	240
	cctgaagatg ttgcaactta ttactgtctg gccagttatg attgtactaa tgggtgattgt	300
	tttgttttcg gcggaggaac caaggtggaa atcaaacgta cgggtgctgc accatctgctc	360
	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa	480
	tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
	agcagcacc ctagcctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
	gtcaccctac agggcctgag ctgcgccgctc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	660
	<210> 3	
15	<211> 1350	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia de anticuerpos diseñada genéticamente	
	<400> 3	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggggggtc cctgagactc	60

ES 2 749 751 T3

tcctgtgcag cctctggatt ctccctcagt aactactacg tgacctgggt ccgtcaggct 120
ccagggaaag ggctggagtg ggtcggcatc atctatggta gtgatgaaac cgcctacgct 180
acctccgcta taggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac cctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacact gctgtgtatt actgtgctag agatgatagt 300
agtgactggg atgcaaagtt caacttgtgg ggccaaggga ccctcgtcac cgtctcgagc 360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 720
ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 780
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacgcc 900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggacgccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacagc 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 4
<211> 651
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de anticuerpos diseñada genéticamente

<400> 4
gctatccaga tgaccagtc tccttcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc aggccagtca gagcattaac aatgagttat cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag ggttatagtc tgaggaacat tgataatgct 300

ES 2 749 751 T3

ttcggcggag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcac 360
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat 420
 aacttctatc ccagagagggc caaagtacag tggaaaggtg ataacgccct ccaatcgggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651

5 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de secreción
 <400> 5
 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Gly

15 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Péptido de secreción
 <400> 6
 Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly
 1 5 10 15

25 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Péptido de secreción
 <400> 7
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala

40 <210> 8
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de secreción
 45

ES 2 749 751 T3

<400> 8
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Glu Gly Val Ser Leu
 20 25 30

Glu Lys Arg
 35

5 <210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 9
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val
 20

15 <210> 10
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 10
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Ser Leu Glu Lys Arg
 20 25

25 <210> 11
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 11
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Glu Gly Val Ser Leu
 20 25 30

35 Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Ala
 35 40

ES 2 749 751 T3

<210> 12
 <211> 85
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Péptido de secreción

 10 <400> 12
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30

 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45

 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60

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

 Ser Leu Glu Lys Arg
 85

 15 <210> 13
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Péptido de secreción

 20 <400> 13
 Met Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Val Arg Ser Val Ser Ile Leu Phe
 1 5 10 15

 Phe Ile Thr Leu Leu His Leu Val Val Ala Leu Asn Asp Val Ala Gly
 20 25 30

 Pro Ala Glu Thr Ala Pro Val Ser Leu Leu Pro Arg
 35 40

 25 <210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Péptido de secreción

 <400> 14

ES 2 749 751 T3

Met Phe Ser Pro Ile Leu Ser Leu Glu Ile Ile Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Gln Ser Val Phe Ala
 20

5 <210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 15
 Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg
 20

15 <210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 16
 Met Ile Phe Leu Lys Leu Ile Lys Ser Ile Val Ile Gly Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Val Ser Ala Ile Gln Ala
 20

25 <210> 17
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 17
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
 20

35 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido de secreción

ES 2 749 751 T3

<400> 18
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser

5 <210> 19
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 19
 Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala
 20

15 <210> 20
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de secreción

<400> 20
 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro
 20

25 <210> 21
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido de secreción

35 <400> 21
 Met Ala Ala Asp Ser Gln Thr Pro Trp Leu Leu Thr Phe Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Trp Pro Gln Glu Pro Gly Ala
 20 25

40 <210> 22
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

ES 2 749 751 T3

<223> Péptido de secreción

<400> 22

Met Lys Lys Asn Arg Met Met Met Met Ile Trp Ser Val Gly Val Val
1 5 10 15

Trp Met Leu Leu Leu Val Gly Gly Ser Tyr Gly
20 25

5

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Péptido de secreción

<400> 23

Met Gln Lys Leu Ile Ile Phe Ala Leu Val Val Leu Cys Val Gly Ser
1 5 10 15

15

Glu Ala

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Péptido de secreción

25

<400> 24

Met Lys Ala Leu Ile Val Leu Gly Leu Val Leu Leu Ser Val Thr Val
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Péptido de secreción

35

<400> 25

Met Val Asp Gly Val Met Ile Leu Pro Val Leu Ile Met Ile Ala Leu
1 5 10 15

Pro Ser Pro Ser
20

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

40

ES 2 749 751 T3

<220>

<223> Péptido de secreción

<400> 26

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

5 Ser Ser Gly

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido de secreción

15 <400> 27

Met Leu Ser Leu Lys Pro Ser Trp Leu Thr Leu Ala Ala Leu Met Tyr
1 5 10 15

Ala Met Leu Leu Val Val Val Pro Phe Ala Lys Pro Val Arg Ala
20 25 30

<210> 28

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido de secreción

25

<400> 28

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Lys Cys
20

REVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína deseada, que comprende:
 - (a) cultivar células eucariotas que comprenden uno o más genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada a una primera temperatura; y
 - 5 (b) cultivar dichas células eucariotas a una segunda temperatura y permitir que dichas células eucariotas produzcan dicha proteína deseada, en donde el cultivo comprende una fase de alimentación discontinua;

en donde

 - (i) dichas células eucariotas comprenden células de levadura que son células de *Pichia pastoris*;
 - (ii) dicha proteína deseada comprende un anticuerpo de longitud completa que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas;
 - 10 (iii) dicha primera temperatura es entre 27,5 grados C y 28,5 grados C y dicha segunda temperatura es entre 30 grados C y 31 grados C;
 - (iv) el promotor o promotores que regulan la transcripción del uno o más genes que codifican dicha proteína deseada no son inducibles por la temperatura;
 - 15 (v) la etapa (a) comprende cultivar dichas células eucariotas en un medio de cultivo que comprende glicerol como una fuente de carbono hasta que dicho glicerol se agota;
 - (vi) el método incluye la adición de un bolo de etanol al cultivo concurrentemente con el agotamiento del glicerol; y
 - (vii) dicho método aumenta el rendimiento de dicha proteína y/o disminuye la abundancia relativa de una o más variantes asociadas al producto en relación con el mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
 - 20
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - (i) dicho método disminuye la abundancia relativa de variantes asociadas al producto que tienen un mayor o menor peso molecular aparente que dicho complejo con múltiples subunidades deseado como se detecta por cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel en relación con el mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura; y/o
 - 25 (ii) dicho método disminuye la abundancia relativa de complejos que tienen enlaces disulfuro aberrantes en relación con el mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura; y/o
 - (iii) dicho método disminuye la abundancia relativa de complejos que tienen cisteínas reducidas en relación con el mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura; y/o
 - 30 (iv) dicho método disminuye la abundancia relativa de complejos que tienen glicosilación aberrante en relación con el mismo método realizado sin una diferencia entre dicha primera temperatura y dicha segunda temperatura.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los genes que proporcionan la expresión de dicha proteína deseada están integrados en uno o más loci genómicos, en donde opcionalmente al menos uno de dichos loci genómicos se selecciona del grupo que consiste en el locus de pGAP, locus de 3' AOX TT; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; y el locus de HIS4 TT.

35
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína deseada se expresa bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en: los promotores de CUP1, AOX1, ICL1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), FLD1, ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5 y Pyk, promotores inducibles por tetraciclina, promotores inducibles por tiamina, promotores quiméricos derivados de estos, promotores de levaduras, promotores de mamíferos, promotores de insectos, promotores vegetales, promotores de reptiles, promotores de anfibios, promotores virales y promotores de aves, y/o en donde al menos uno de los genes que codifican subunidades de dicha proteína deseada se expresa bajo el control de un promotor inducible o constitutivo, en donde, opcionalmente, dicho promotor inducible se selecciona del grupo que consiste en los promotores AOX1, CUP1, inducible por tetraciclina, inducible por tiamina, y FLD1.

40
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha célula de *Pichia pastoris* es una célula haploide, diploide, tetraploide, o poliploide.

45

- 5 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además purificar dicha proteína deseada de dichas células de *Pichia pastoris* o del medio de cultivo, en donde, opcionalmente, dicha proteína deseada se purifica de un componente intracelular, citoplasma, nucleoplasma, o una membrana de dichas células de *Pichia pastoris*, y/o en donde, opcionalmente, dichas células de *Pichia pastoris* secretan dicha proteína deseada en el medio de cultivo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha primera temperatura es 28 grados C y dicha segunda temperatura es 30 grados C o 31 grados C.
- 10 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína deseada comprende un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo opcionalmente humanizado u opcionalmente humano específico para IL-6, TNF α , CGRP, PCSK9, HGF, o NGF.

mAb1
3 cepas

A312 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09 – 1,15

A326 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09 – 1,15

A343 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09 – 1,15

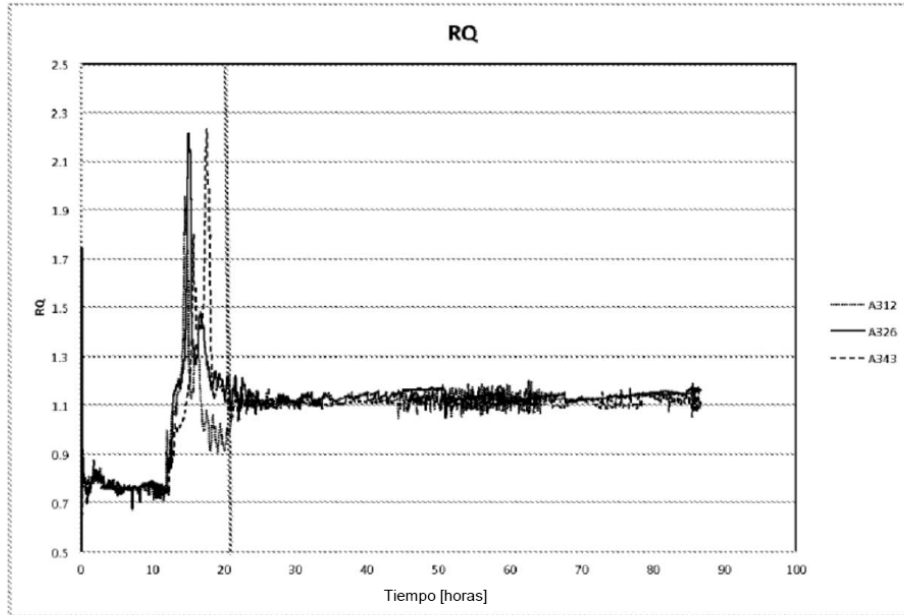


Figura 1: Perfil del control de RQ para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb1 A, B y C en fermentadores de 20L

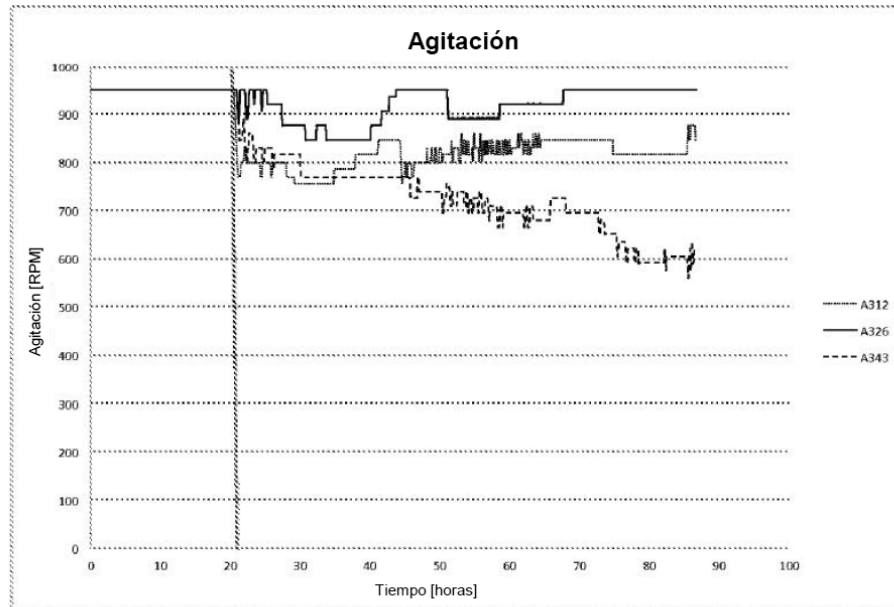


Figura 2: Perfil de agitación indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb1 A, B y C en fermentadores de 20L

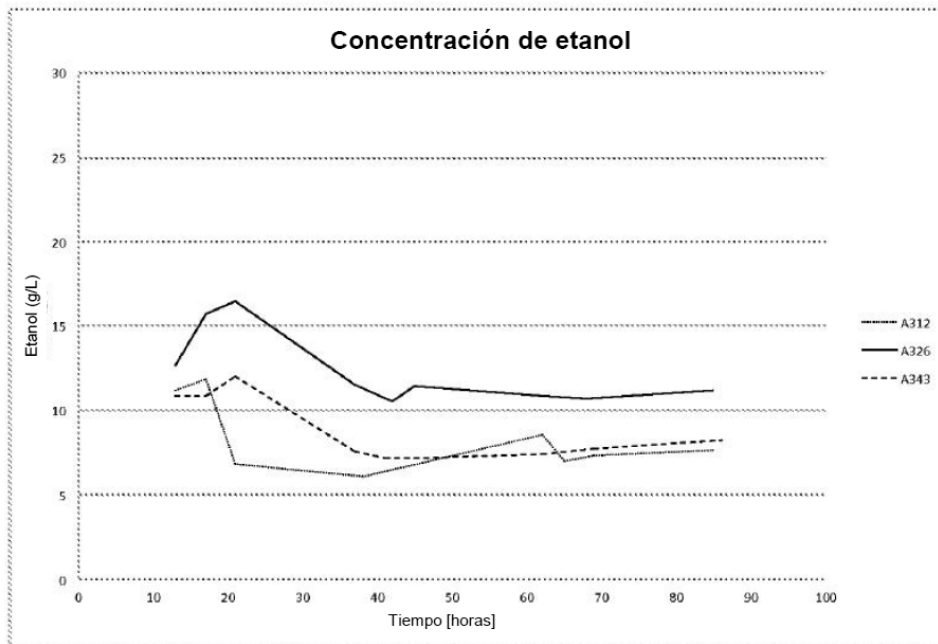


Figura 3: Perfil de concentración de etanol indicando el efecto del control de RQ en el mantenimiento de niveles no tóxicos de etanol para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb1 A, B y C en fermentadores de 20L

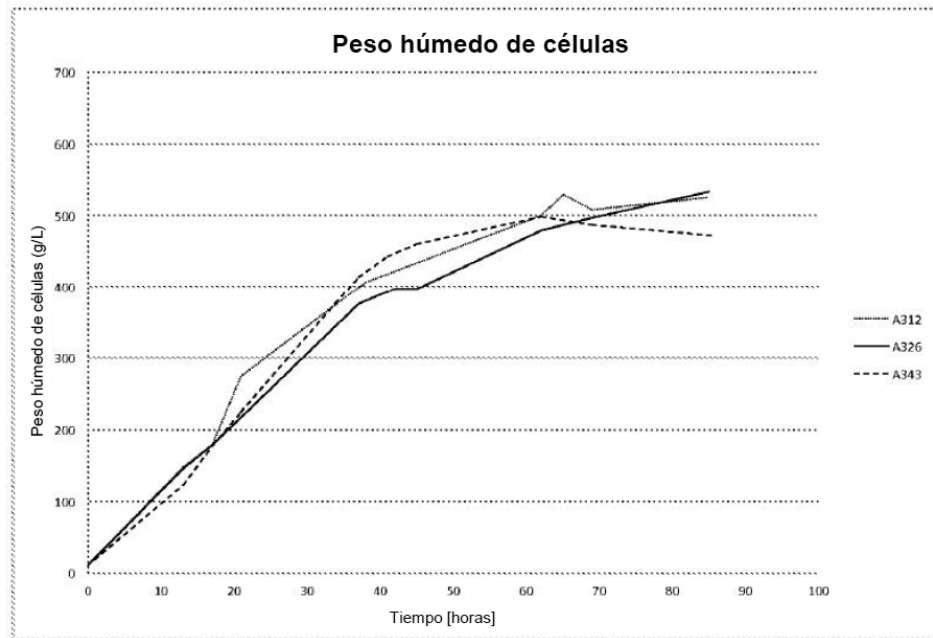


Figura 4: perfil de crecimiento celular indicando la similitud en el crecimiento celular para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb1 A, B y C en fermentadores de 20L

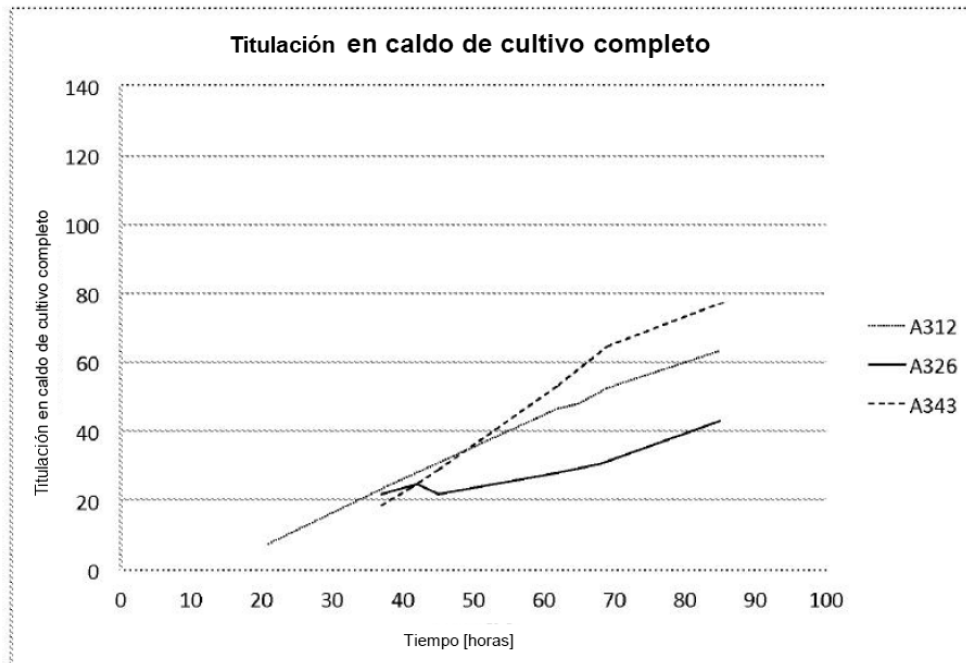


Figura 5: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto para 3 cepas diferentes de anticuerpo anti mAb1 A, B y C en fermentadores de 20L

3 puntos de ajuste de RQ

A277 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,19- 1,25

A278 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,29- 1,35

A296 = mAb1 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

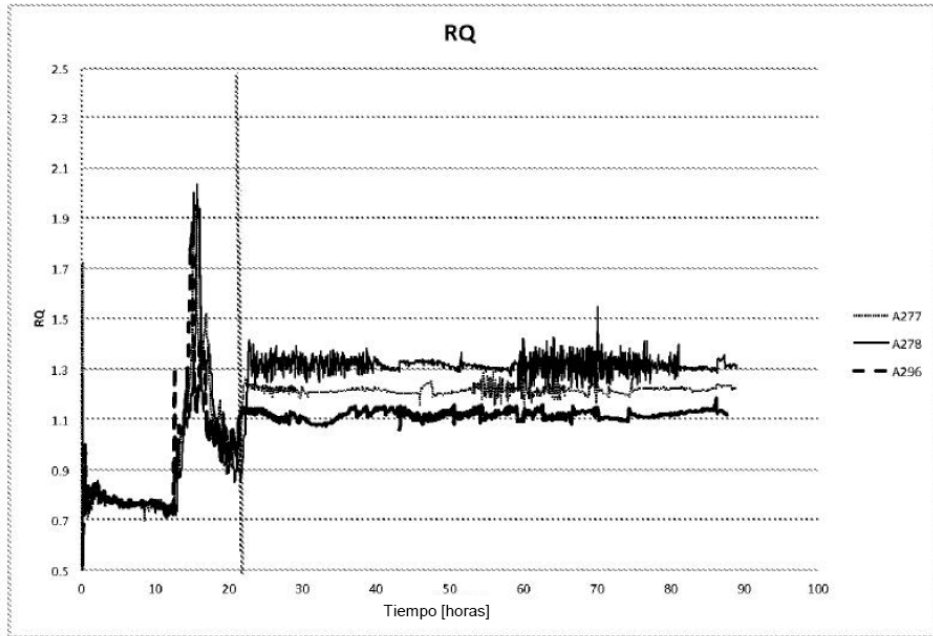


Figura 6: Perfil de control de RQ para 3 puntos de ajuste de control de RQ para anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

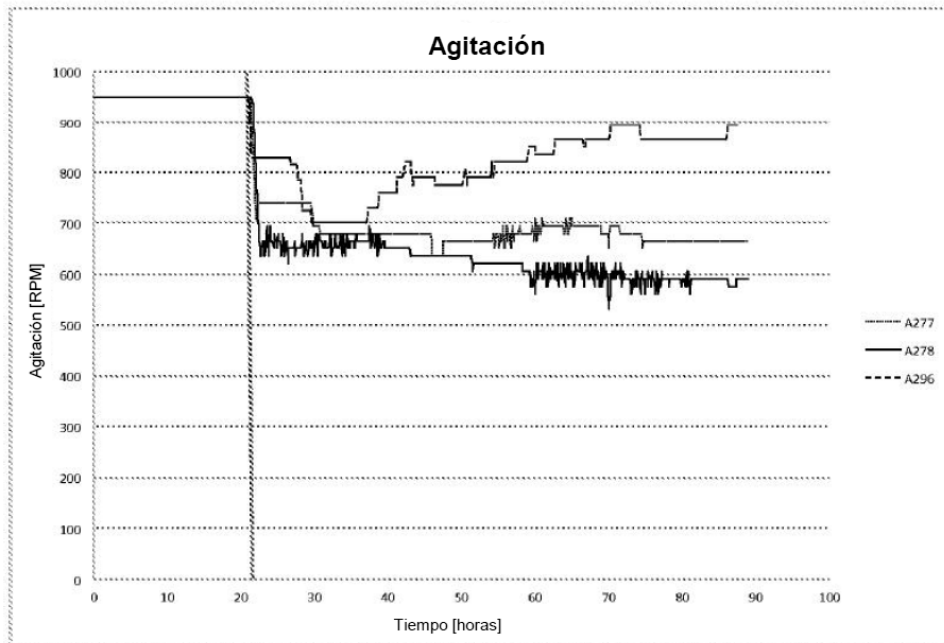


Figura 7: Perfil de agitación para 3 puntos de ajuste del control de RQ indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

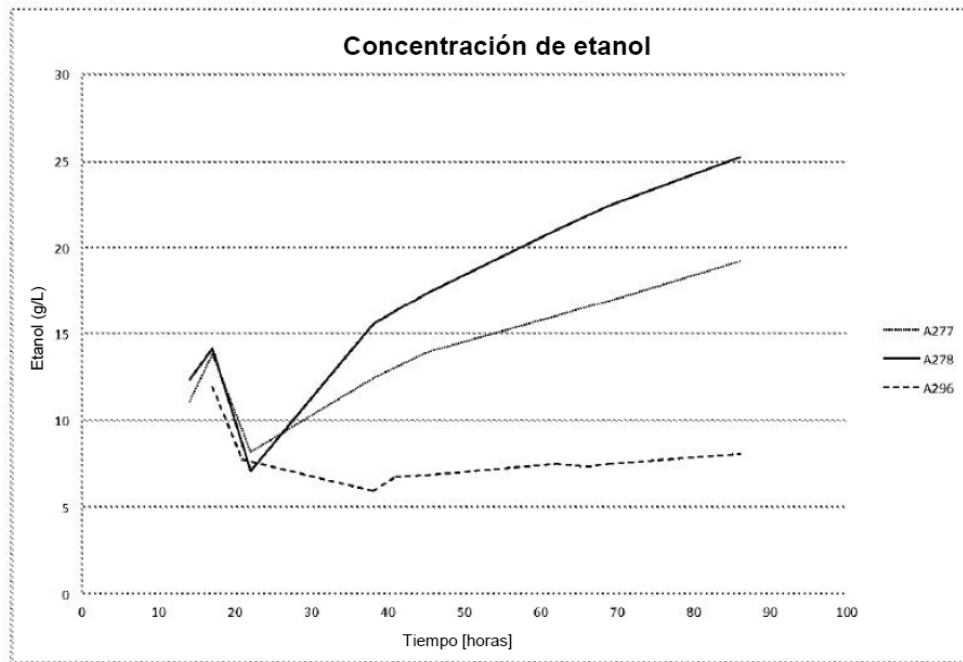


Figura 8: Perfil de concentración de etanol para 3 puntos de ajuste del control de RQ indicando el efecto del control de RQ en el mantenimiento de niveles no tóxicos de etanol para anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

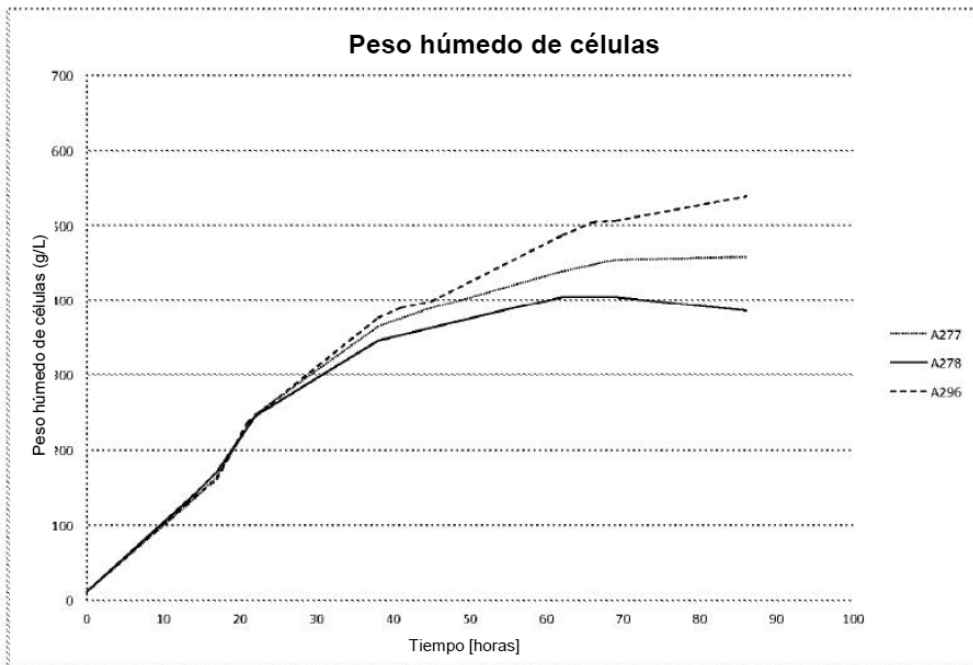


Figura 9: Perfil de crecimiento celular para 3 puntos de ajuste del control de RQ indicando crecimiento celular para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

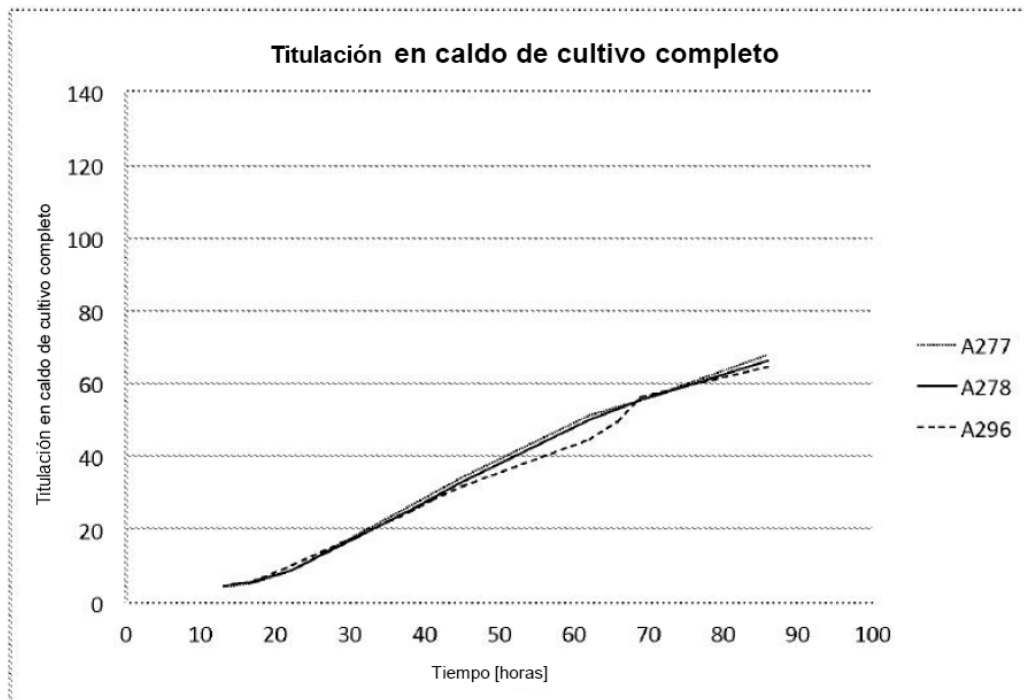


Figura 10: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo para 3 puntos de ajuste del control de RQ indicando la expresión del producto para anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

Aeróbico vs Hipóxico

A291 = mAb1 Cepa A Aeróbico

A296 = mAb1 Cepa A Hipóxico,

Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, 11 g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

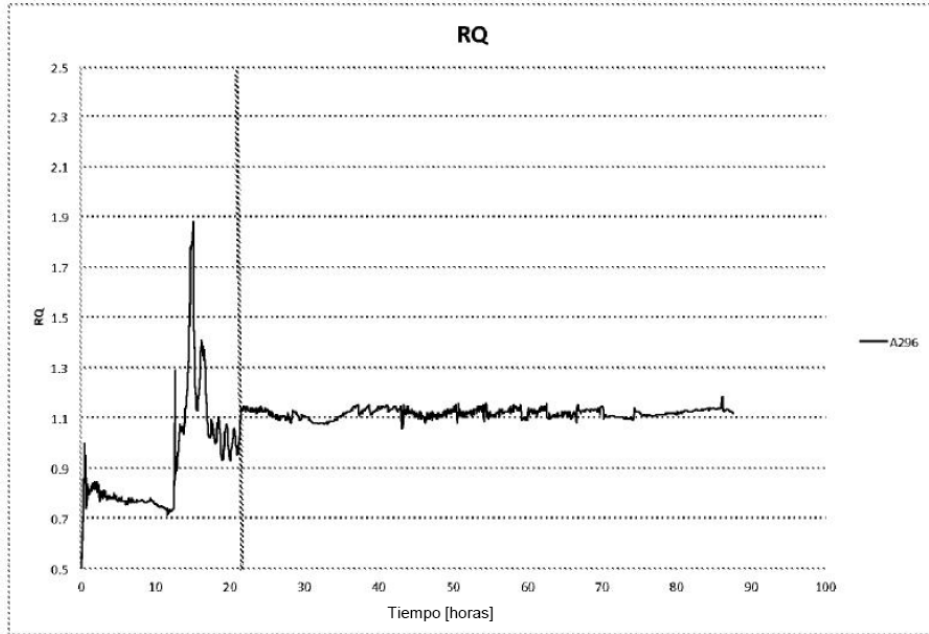


Figura 11: Perfil de control de RQ para comparación de estado de oxigenación aeróbico e hipóxico para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L. Ambas fermentaciones se operaron a las mismas tasas de alimentación. El perfil de RQ no se muestra para el estado aeróbico.

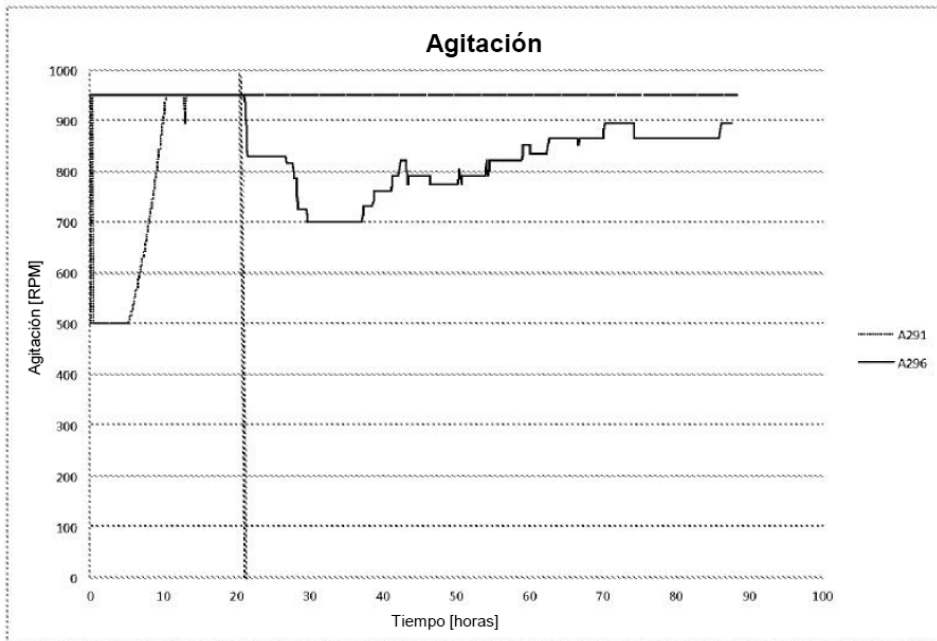


Figura 12: Perfil de agitación indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para fermentación hipóxica y agitación constante para fermentación aeróbica para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

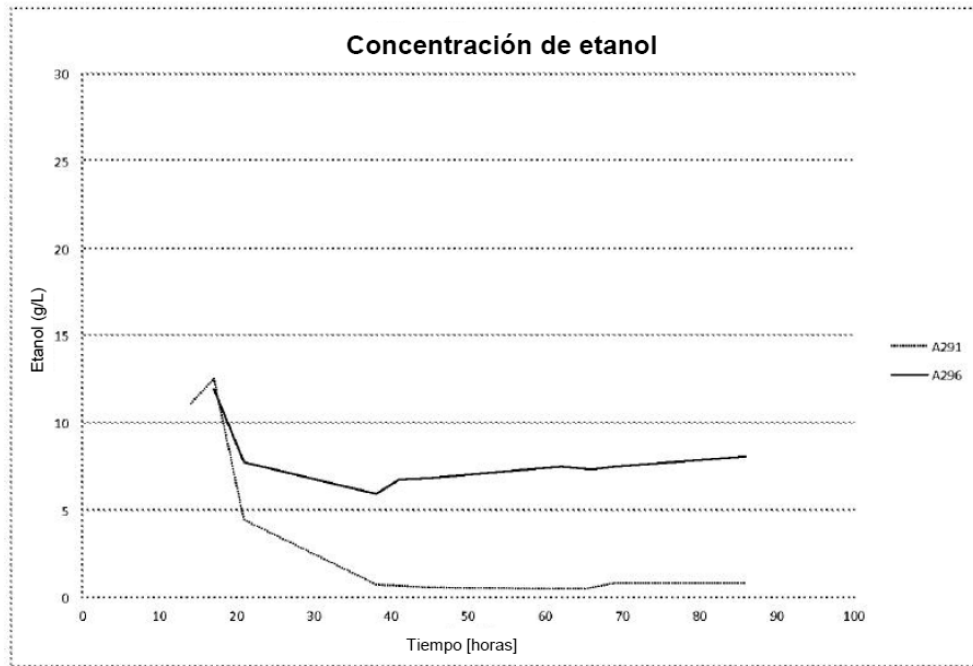


Figura 13: Perfil de concentración de etanol indicando el efecto del control de RQ en el mantenimiento de niveles no tóxicos de etanol para fermentación hipóxica y estado no fermentativo para fermentación aeróbica para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

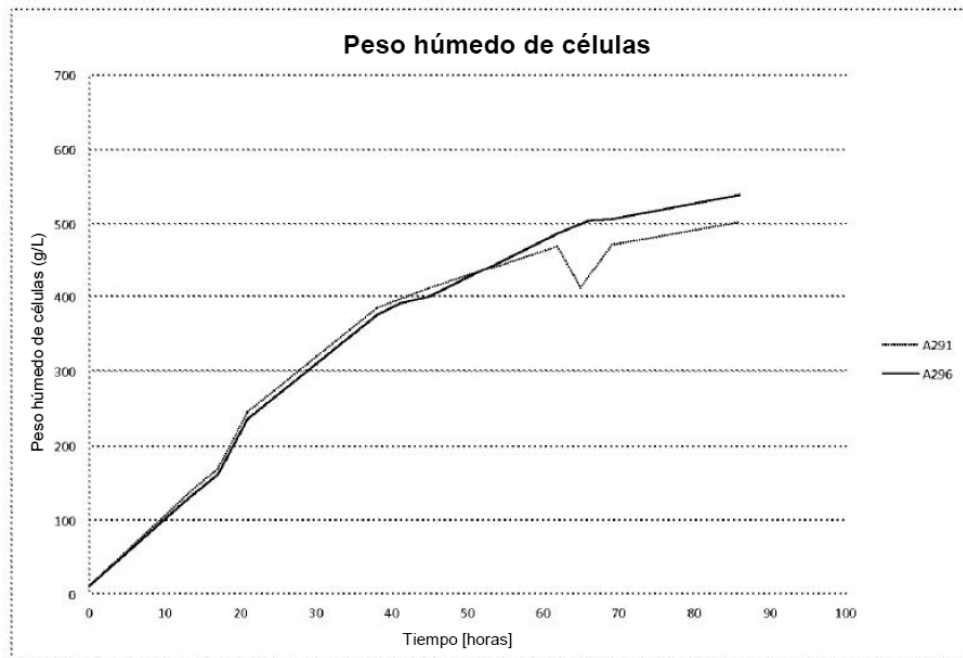


Figura 14: Perfil de crecimiento celular indicando similitud del crecimiento celular para fermentación hipóxica y fermentación aeróbica para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

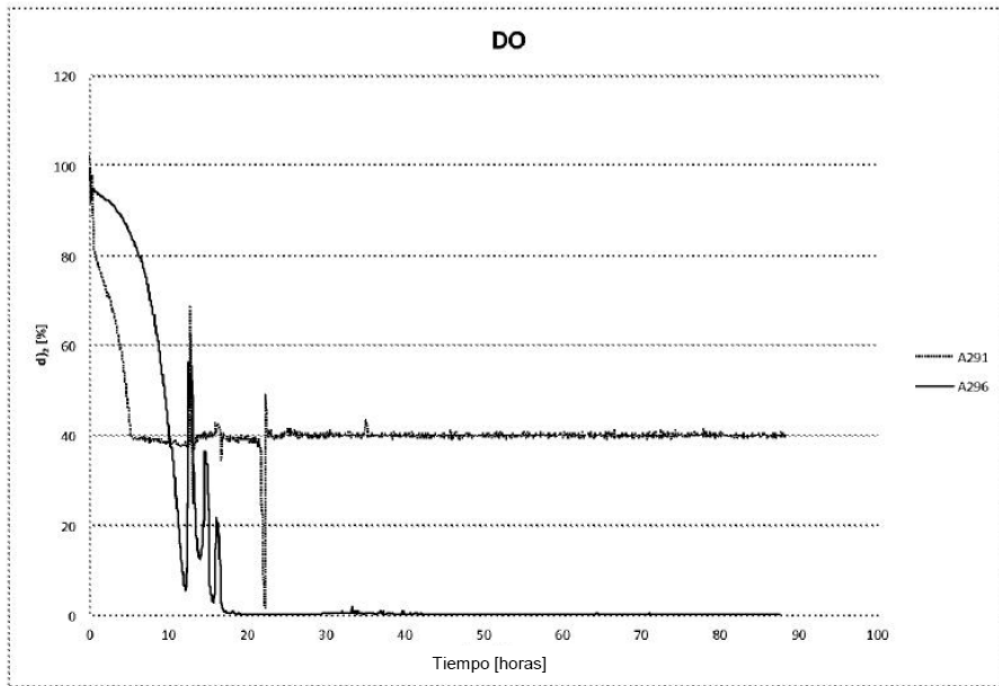


Figura 15: Perfil de % de DO (saturación de aire) indicando un DO de 40% controlado (saturación de aire) para fermentación aeróbica y un % de DO no detectable (saturación de aire) después de 17 horas para la fermentación hipóxica para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

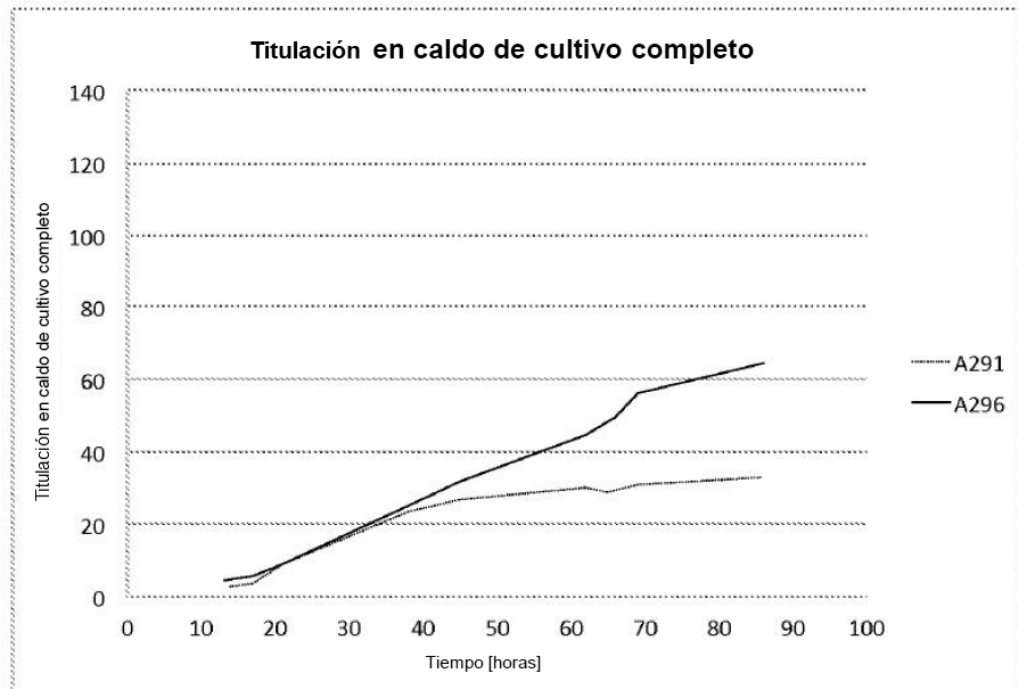


Figura 16: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto para fermentaciones hipóxica y aeróbica para el anticuerpo mAb1 Cepa A en fermentadores de 20L

4 cepas

A158 = mAb2 Cepa A Tasa de alimentación = 18/15 paso, RQ = 1,09-1,15, Sin Bolo de EtOH
 A162 = mAb2 Cepa B Tasa de alimentación = 18/15 paso, RQ = 1,09-1,15, Sin Bolo de EtOH
 A163 = mAb2 Cepa C Tasa de alimentación = 18/15 paso, RQ = 1,09-1,15, Sin Bolo de EtOH
 A173 = mAb2 Cepa D Tasa de alimentación = 18/15 paso, RQ = 1,09-1,15, Sin Bolo de EtOH

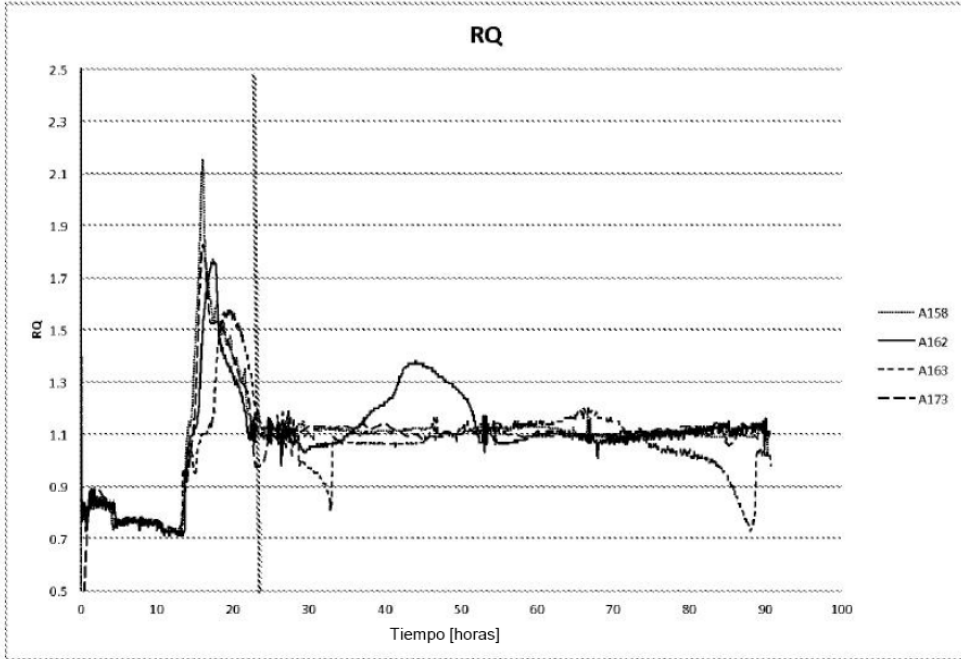


Figura 17: Perfil de control de RQ para 4 cepas diferentes de anticuerpo mAb2 A, B, C y D en fermentadores de 20L

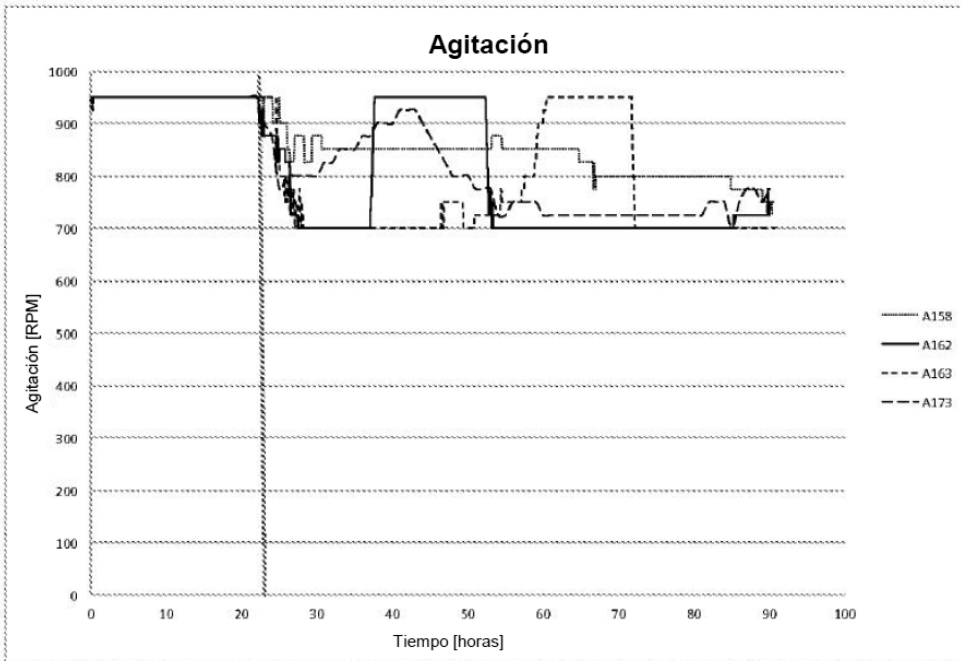


Figura 18: Perfil de agitación indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para 4 cepas diferentes de anticuerpo mAb2 A, B, C y D en fermentadores de 20L

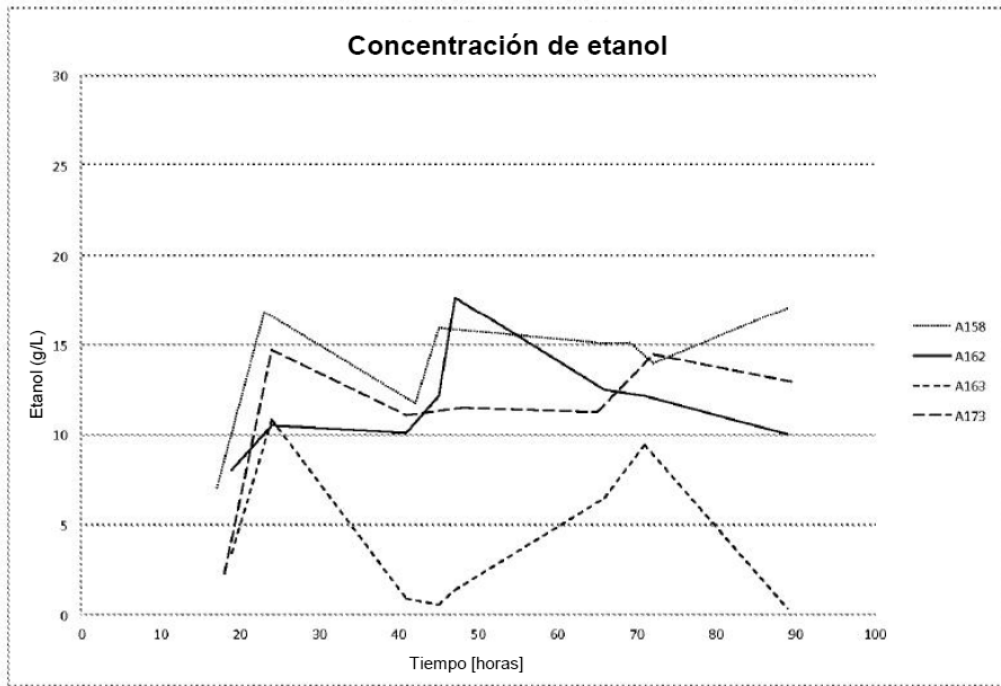


Figura 19: Perfil de concentración de etanol indicando el efecto del control de RQ en el mantenimiento de niveles no tóxicos de etanol para 4 cepas diferentes de anticuerpo mAb2 A, B, C y D en fermentadores de 20L

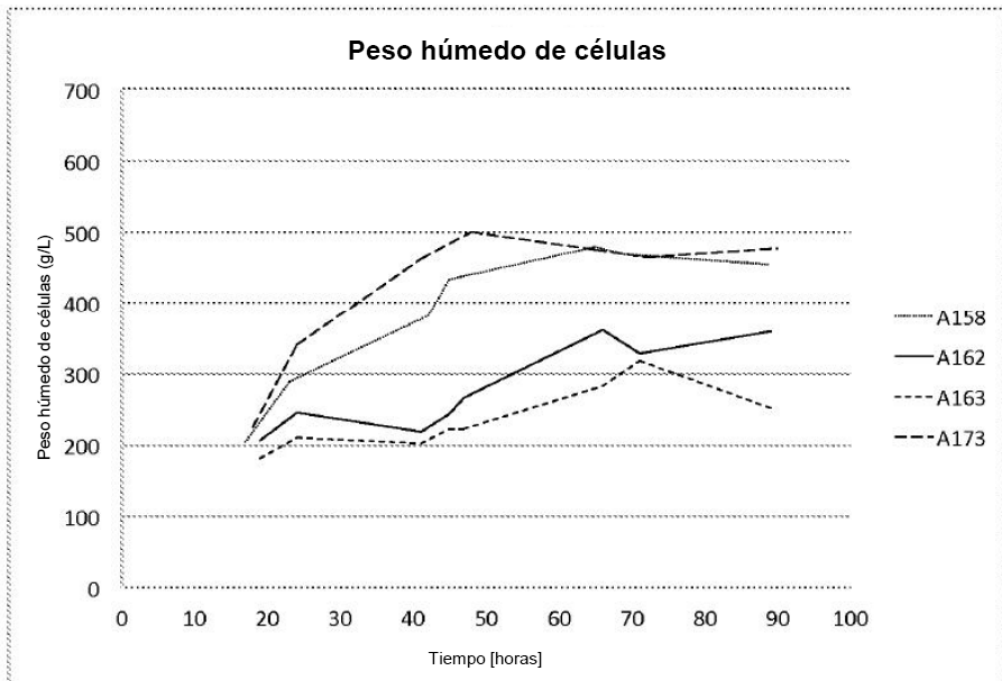


Figura 20: Perfil de crecimiento de celular indicando las diferencias en el crecimiento celular para 4 cepas diferentes de anticuerpo mAb2 A, B, C y D en fermentadores de 20L

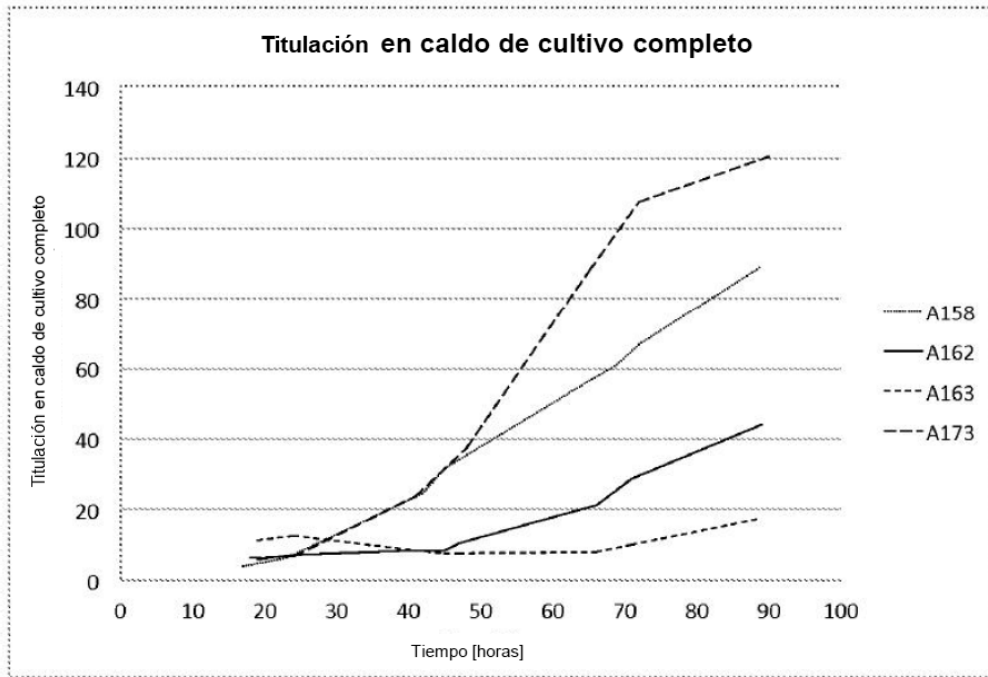


Figura 21: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto para 4 cepas diferentes de anticuerpo mAb2 A, B, C y D en fermentadores de 20L

mAb3
3 cepas

A225 = mAb3 Cepa A Tasa de alimentación = 9g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15
 A227 = mAb3 Cepa B Tasa de alimentación = 9g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15
 A234 = mAb3 Cepa C Tasa de alimentación = 9g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

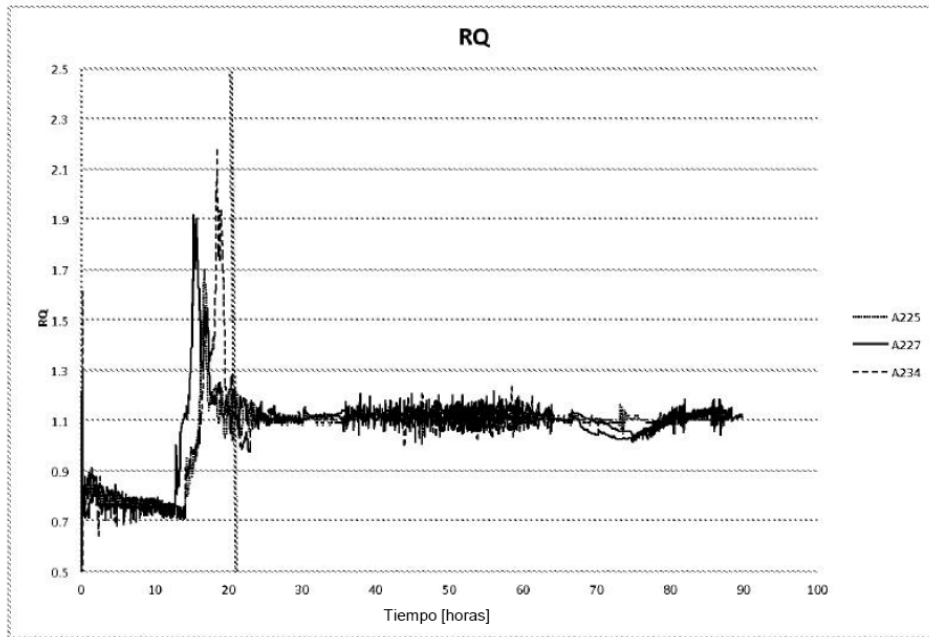


Figura 22: Perfil de control de RQ para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb3 Cepas A, B y C en fermentadores de 20L

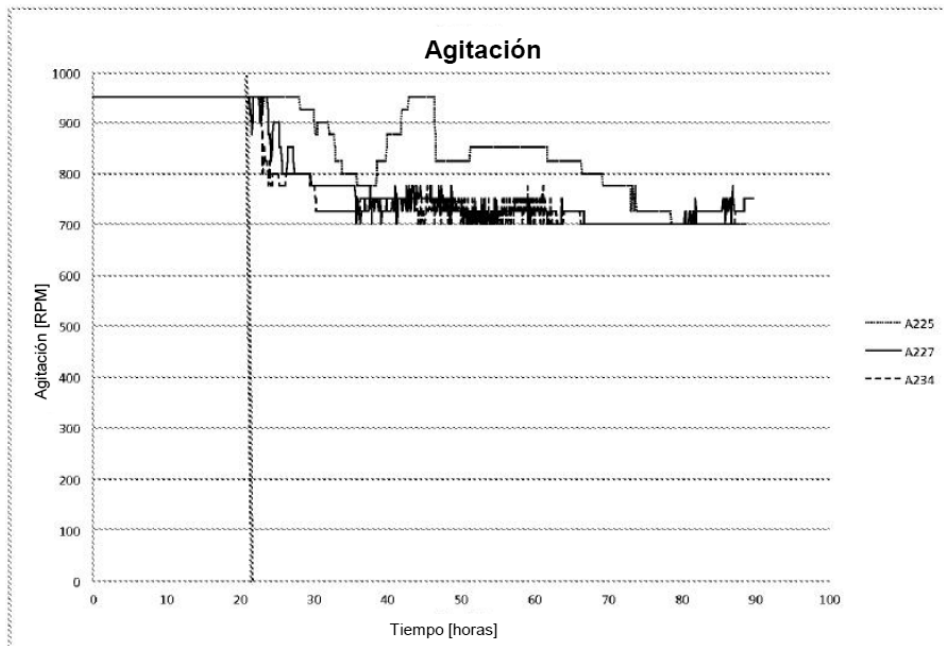


Figura 23: Perfil de agitación indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb3 Cepas A, B y C en fermentadores de 20L

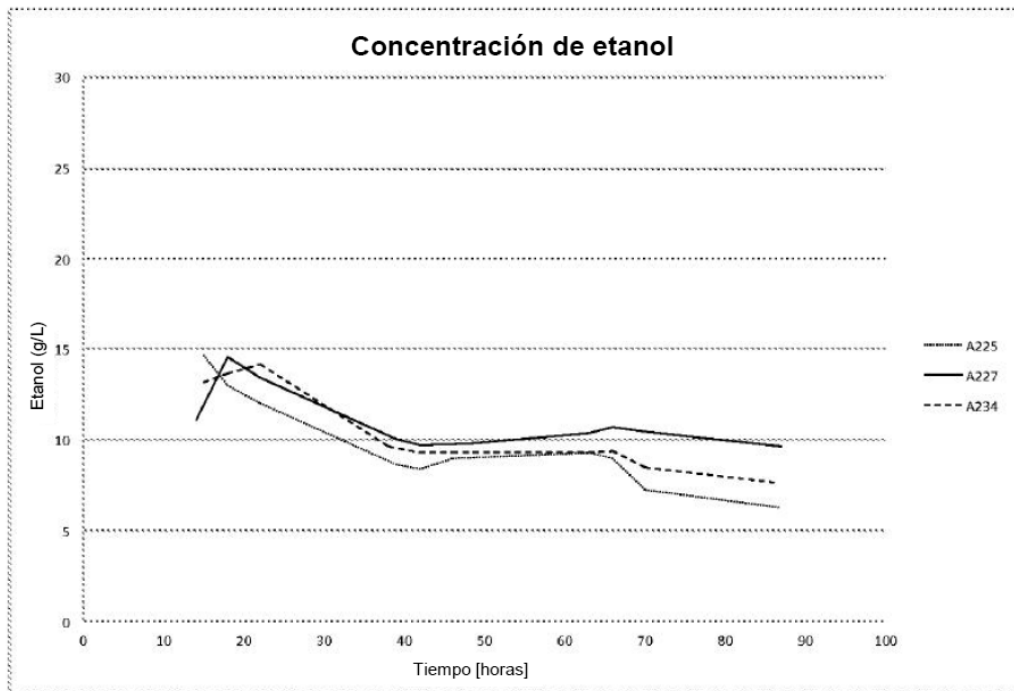


Figura 24: Perfil de concentración de etanol indicando el efecto del RQ para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb3 Cepas A, B y C en fermentadores de 20L

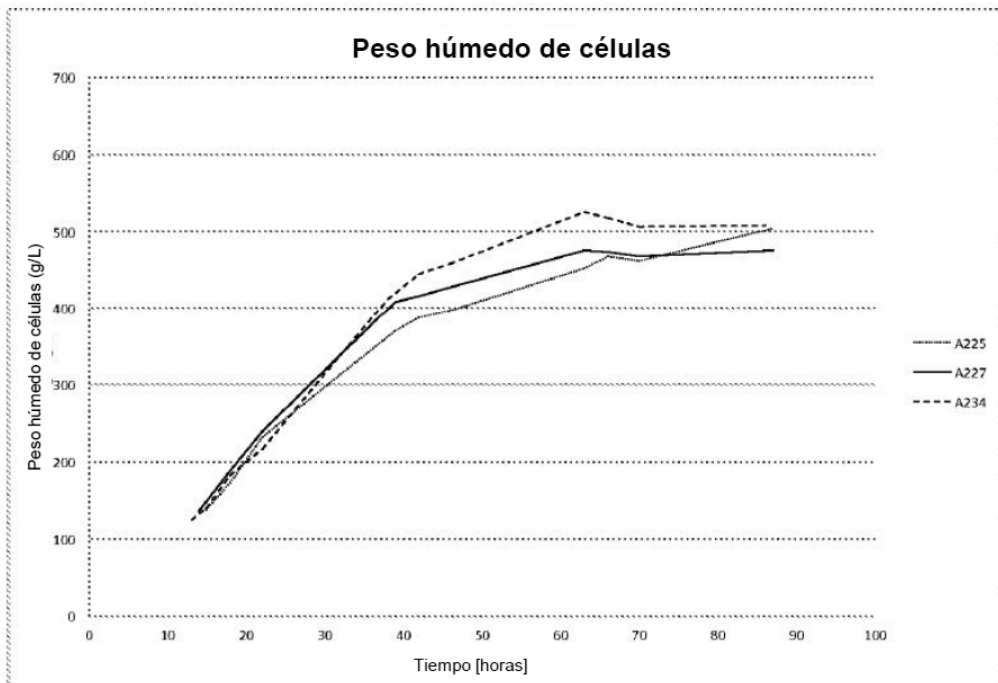


Figura 25: perfil del crecimiento celular indicando crecimiento celular para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb3 Cepas A, B y C en fermentadores de 20L

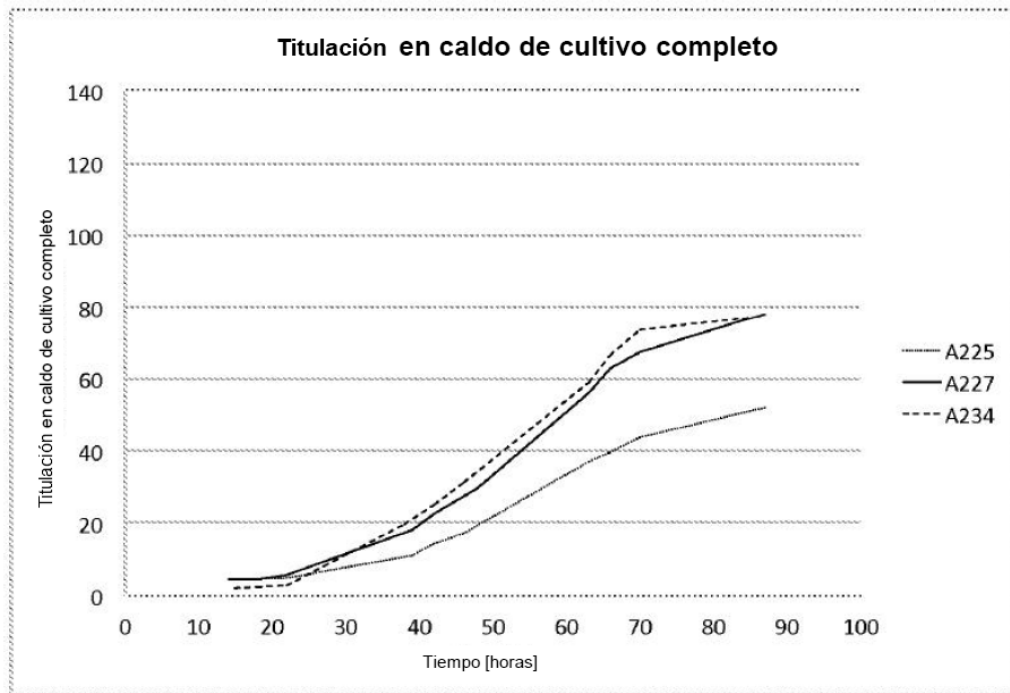


Figura 26: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto para 3 cepas diferentes de anticuerpo mAb3 A, B y C en fermentadores de 20L

mAb3

4 tasas de alimentación

A226 = mAb3 Cepa B Tasa de alimentación = 9 g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

A230 = mAb3 Cepa B Tasa de alimentación = 11g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

A235 = mAb3 Cepa B Tasa de alimentación = 6 g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

A238 = mAb3 Cepa B Tasa de alimentación = 7 g/l/hr, 11g/l Bolo de EtOH, RQ = 1,09- 1,15

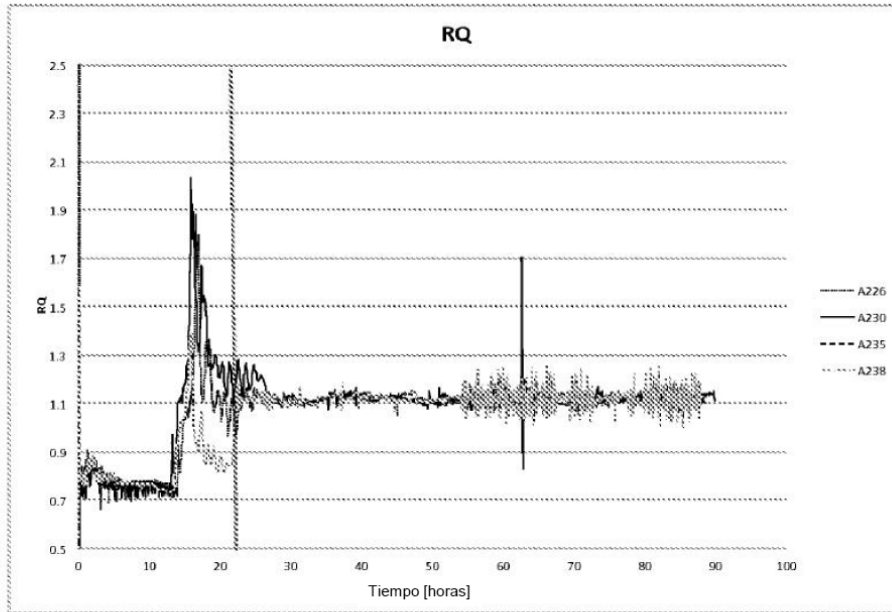


Figura 27: Perfil de control de RQ para 4 tasas de alimentación diferentes para la cepa de anticuerpo mAb3 Cepa B en fermentadores de 20L

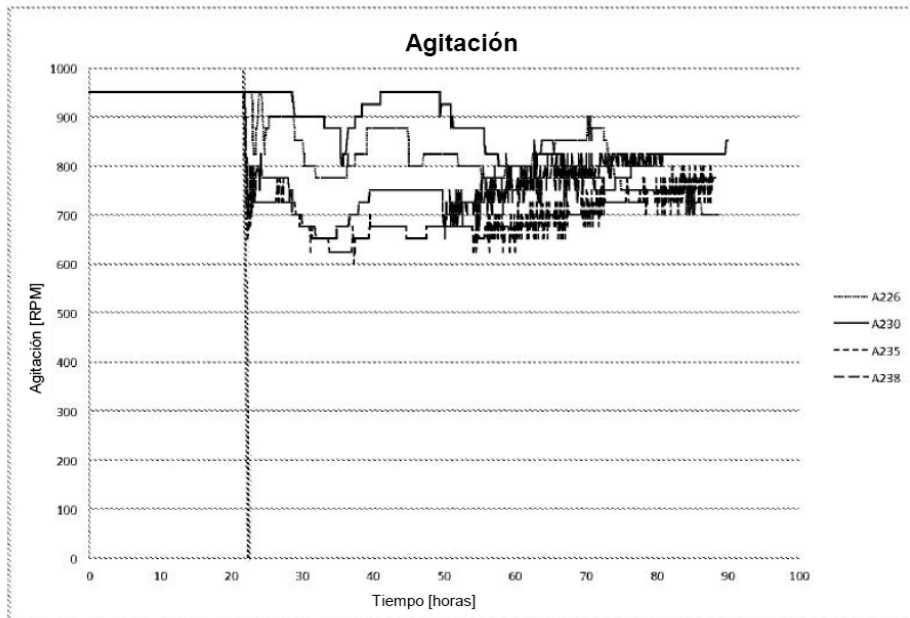


Figura 28: Perfil de agitación para 4 tasas de alimentación diferentes indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado para la cepa de anticuerpo mAb3 Cepa B en fermentadores de 20L

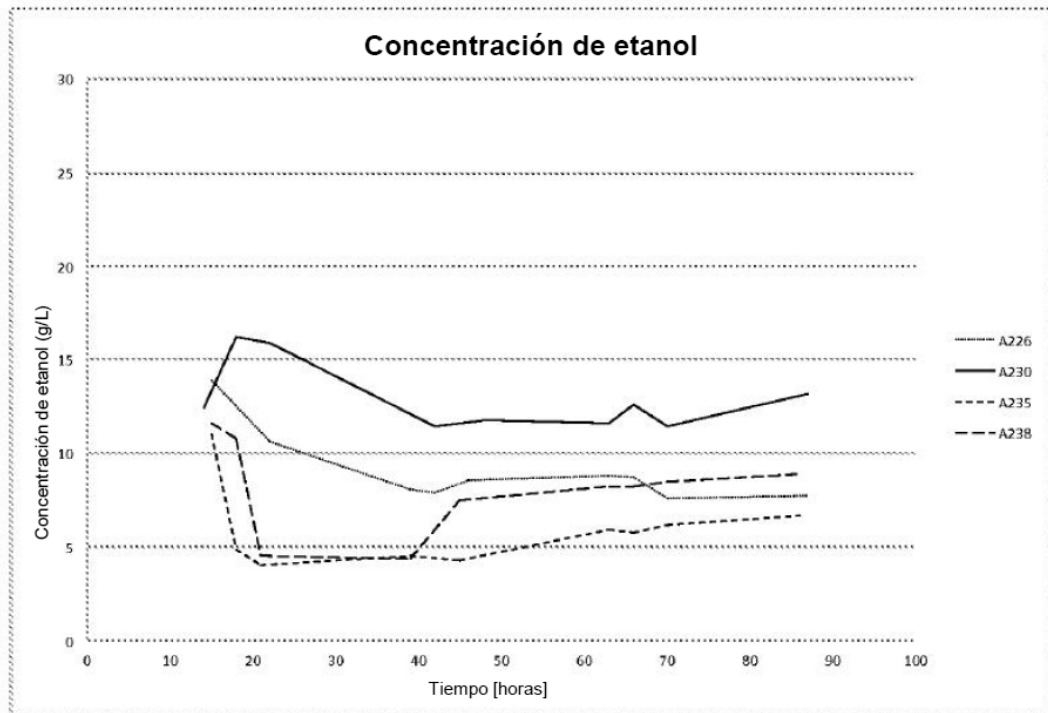


Figura 29: Perfil de concentración de etanol para 4 tasas de alimentación diferentes indicando el efecto de of RQ para la cepa de anticuerpo mAb3 Cepa B en fermentadores de 20L

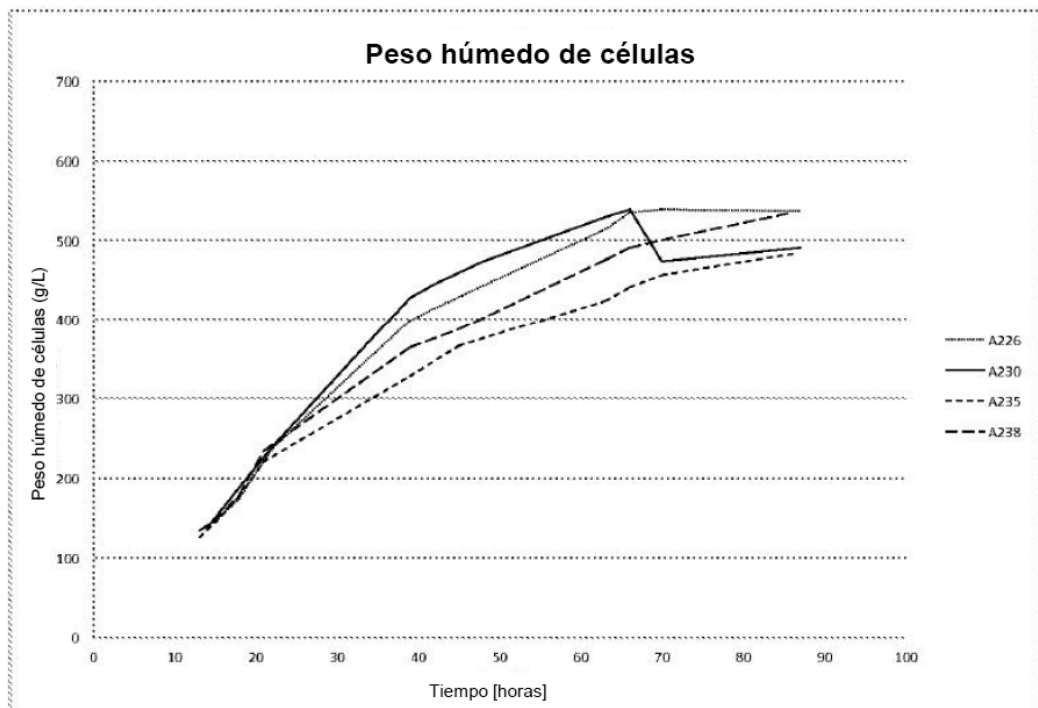


Figura 30: Perfil de crecimiento celular para 4 tasas de alimentación diferentes indicando crecimiento celular para la cepa de anticuerpo mAb3 Cepa B en fermentadores de 20L

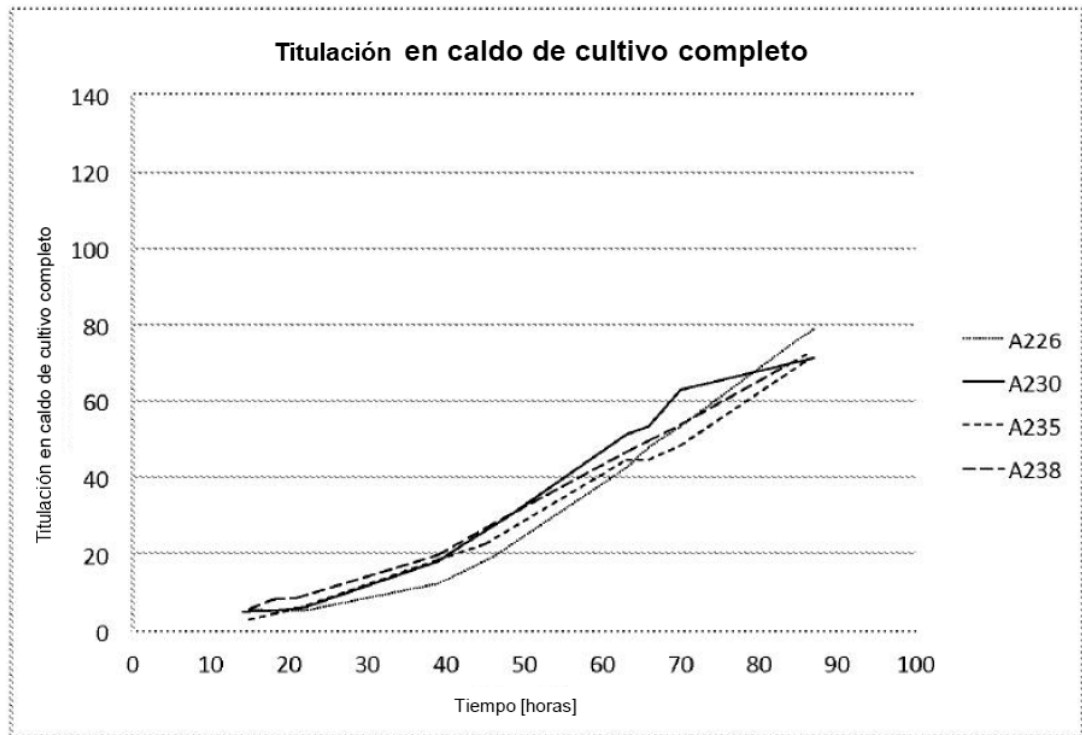


Figura 31: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo para 4 tasas de alimentación diferentes indicando la expresión del producto para la cepa del anticuerpo mAb3 B en fermentadores de 20L

mAb4
2 tasas de alimentación

A197 = mAb4 Cepa A Tasa de alimentación = 13 g/l/hr, RQ = 1,09- 1,15, Sin Bolo de EtOH
 A198 = mAb4 Cepa A Tasa de alimentación = 11 g/l/hr, RQ = 1,09- 1,15, Sin Bolo de EtOH

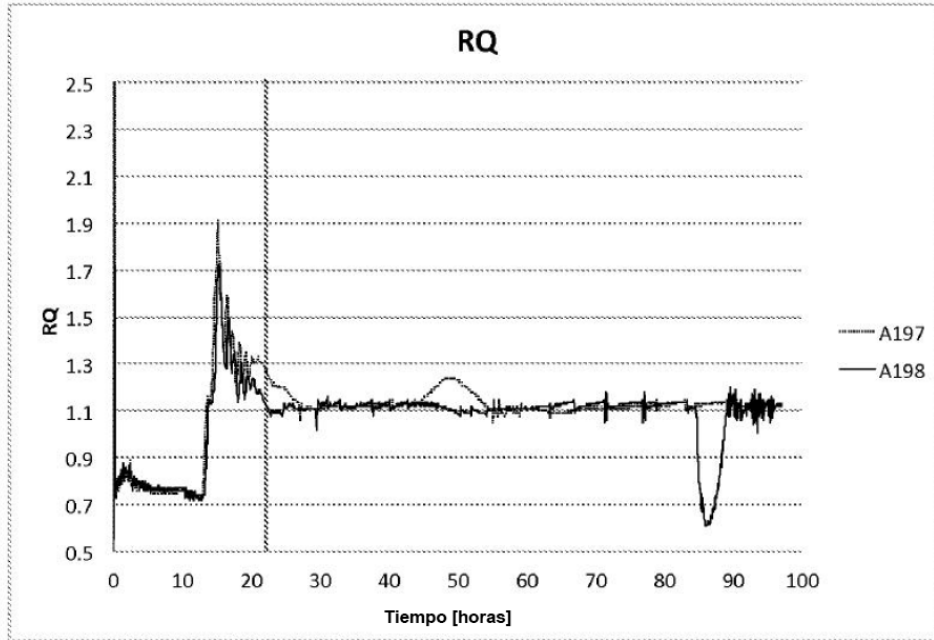


Figura 32: Perfil del control de RQ a tasas de alimentación diferentes para la cepa del anticuerpo mAb4 A con una secuencia diferente en la región CDR en fermentadores de 20L

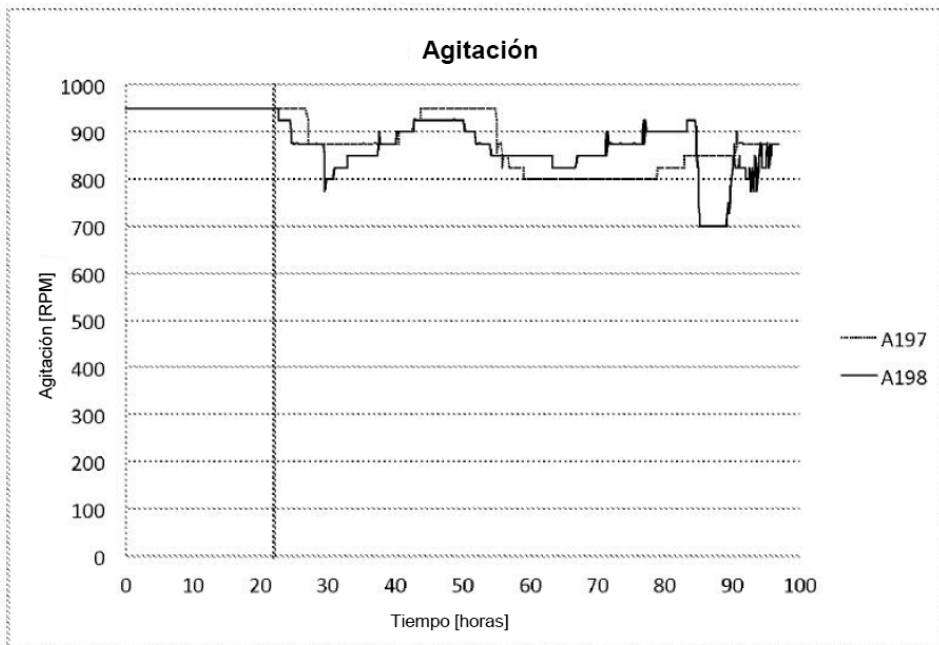


Figura 33: Perfil de agitación indicando la respuesta de la agitación para mantener el RQ deseado a tasas de alimentación diferentes para la cepa del anticuerpo mAb4 A con una secuencia diferente en la región CDR en fermentadores de 20L

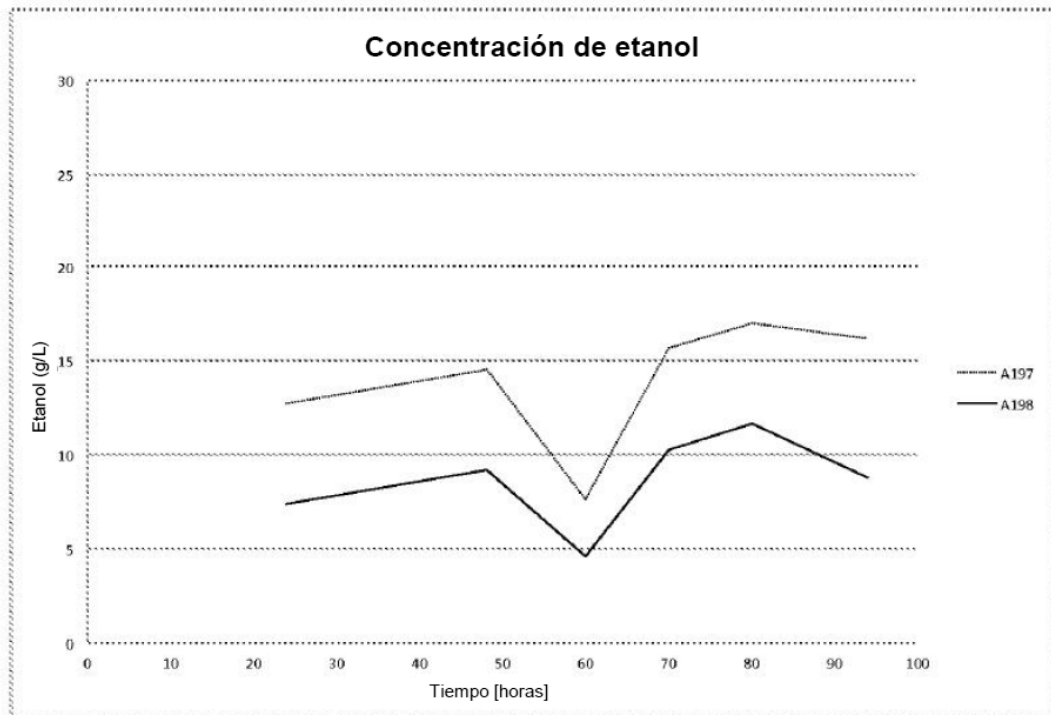


Figura 34: Perfil de concentración de etanol indicando efecto de las diferentes tasas de alimentación para la cepa del anticuerpo mAb4 A con una secuencia diferente en la región CDR en fermentadores de 20L

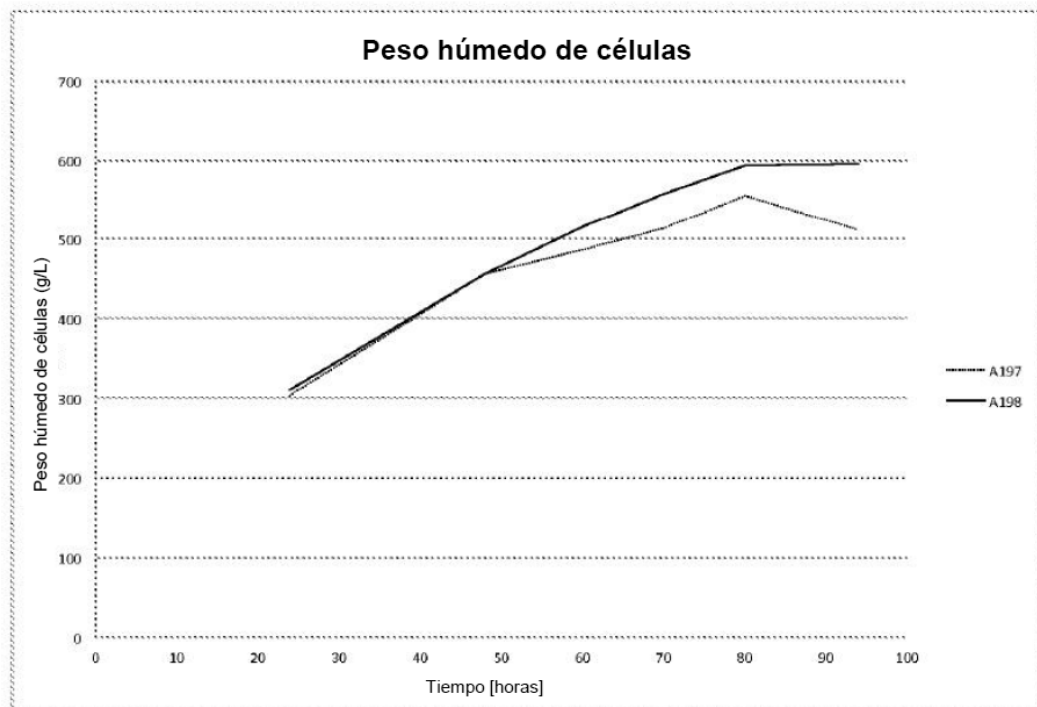


Figura 35: Perfil de crecimiento celular indicando crecimiento celular a diferentes tasas de alimentación para la cepa del anticuerpo mAb4 A con una secuencia diferente en la región CDR en fermentadores de 20L

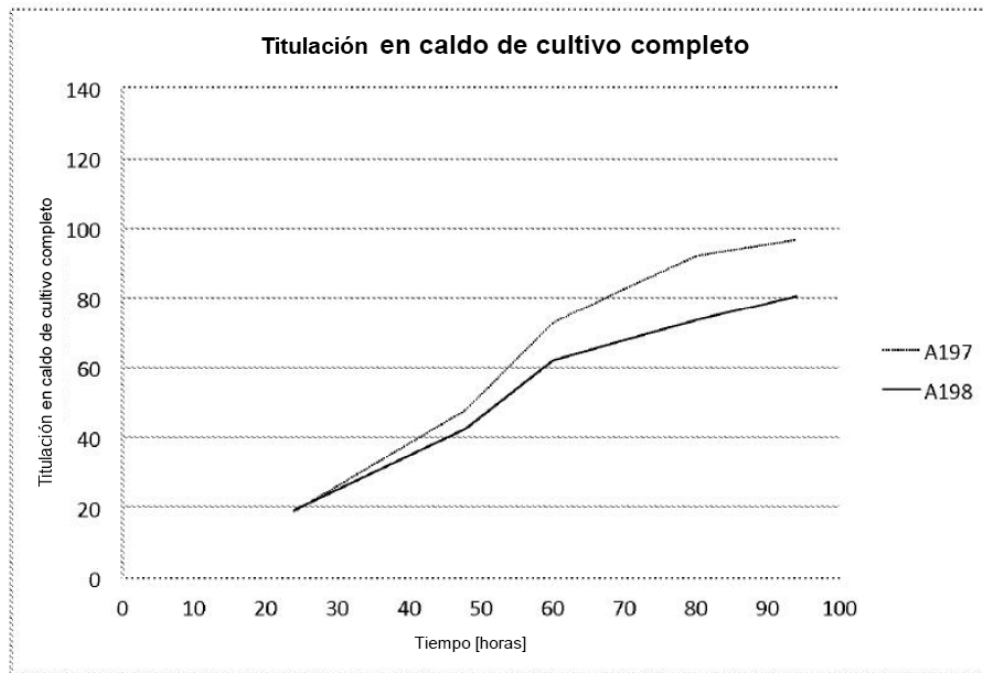


Figura 36: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto a diferentes tasas de alimentación para la cepa del anticuerpo mAb4 A con una secuencia diferente en la región CDR en fermentadores de 20L

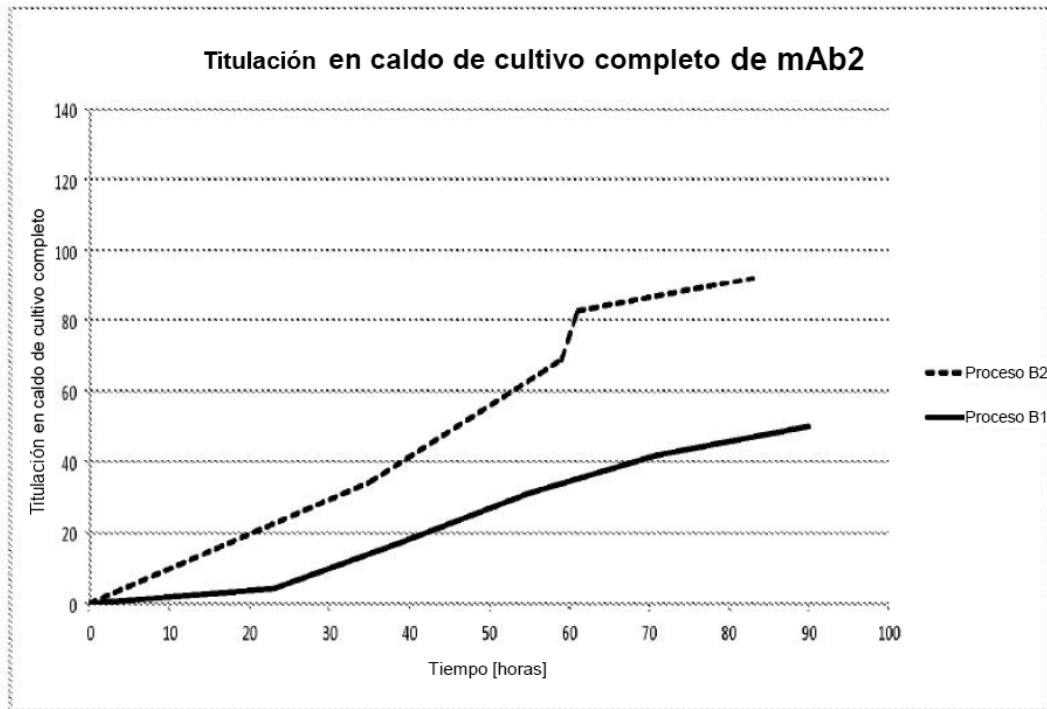


Figura 37: Perfil de titulación de caldo de cultivo completo indicando la expresión del producto para fermentación aeróbica para la cepa del anticuerpo mAb2 A en fermentadores a gran escala

Cepa A de mAb1 A291 y A296 SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras a EFT 62,70,86 horas Aeróbica vs. Hipóxica

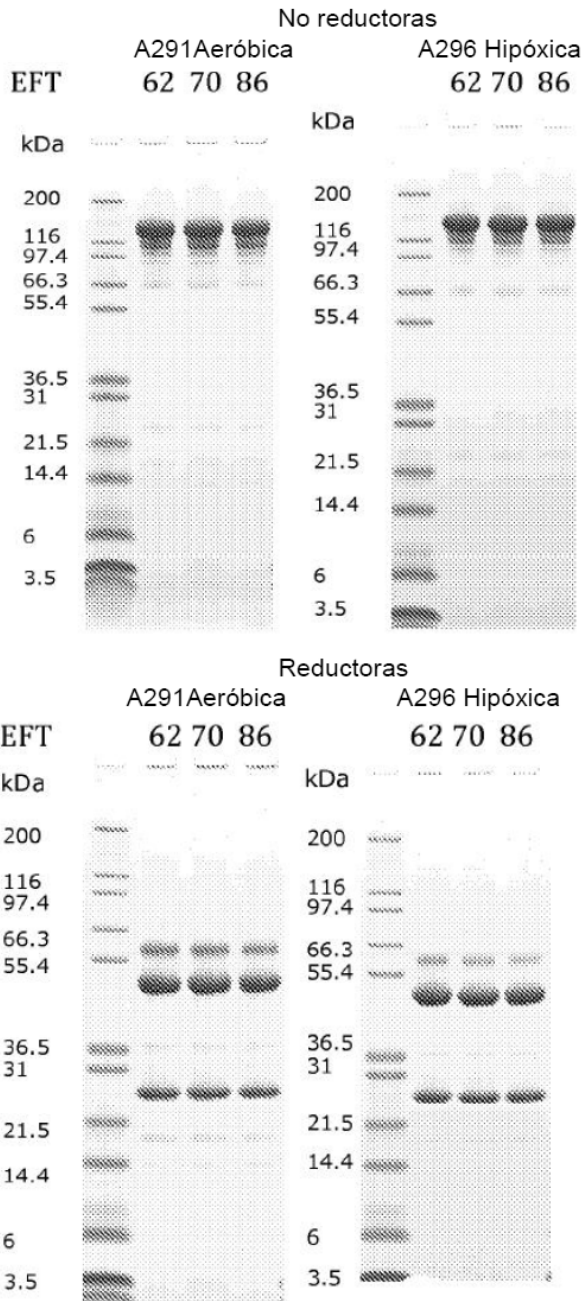


Figura 38: Muestra el gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras para fermentación aeróbica y una fermentación hipóxica para la cepa del anticuerpo mAb1 A a 3 tiempos de fermentación diferentes en fermentadores de 20L

Cepa A de mAb1 A312 SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras a EFT 62,69,85 horas Hipóxica

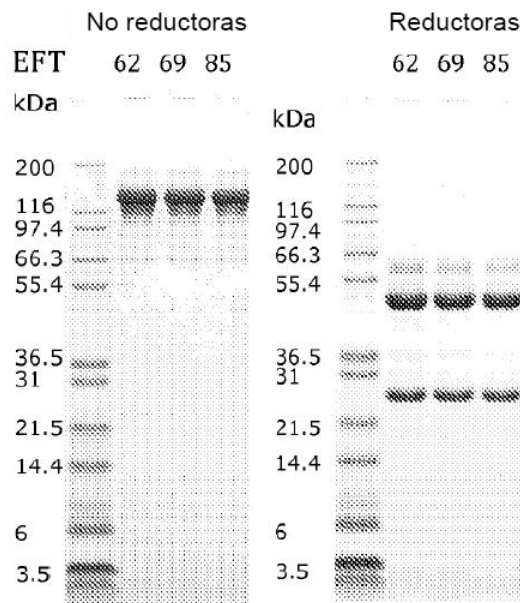


Figura 39: muestra el gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras para fermentación hipóxica para la cepa A de mAb1 a 3 tiempos de fermentación diferentes en fermentadores de 20L

FIG. 40. La titulación de Ab aumenta por cambio en la temperatura

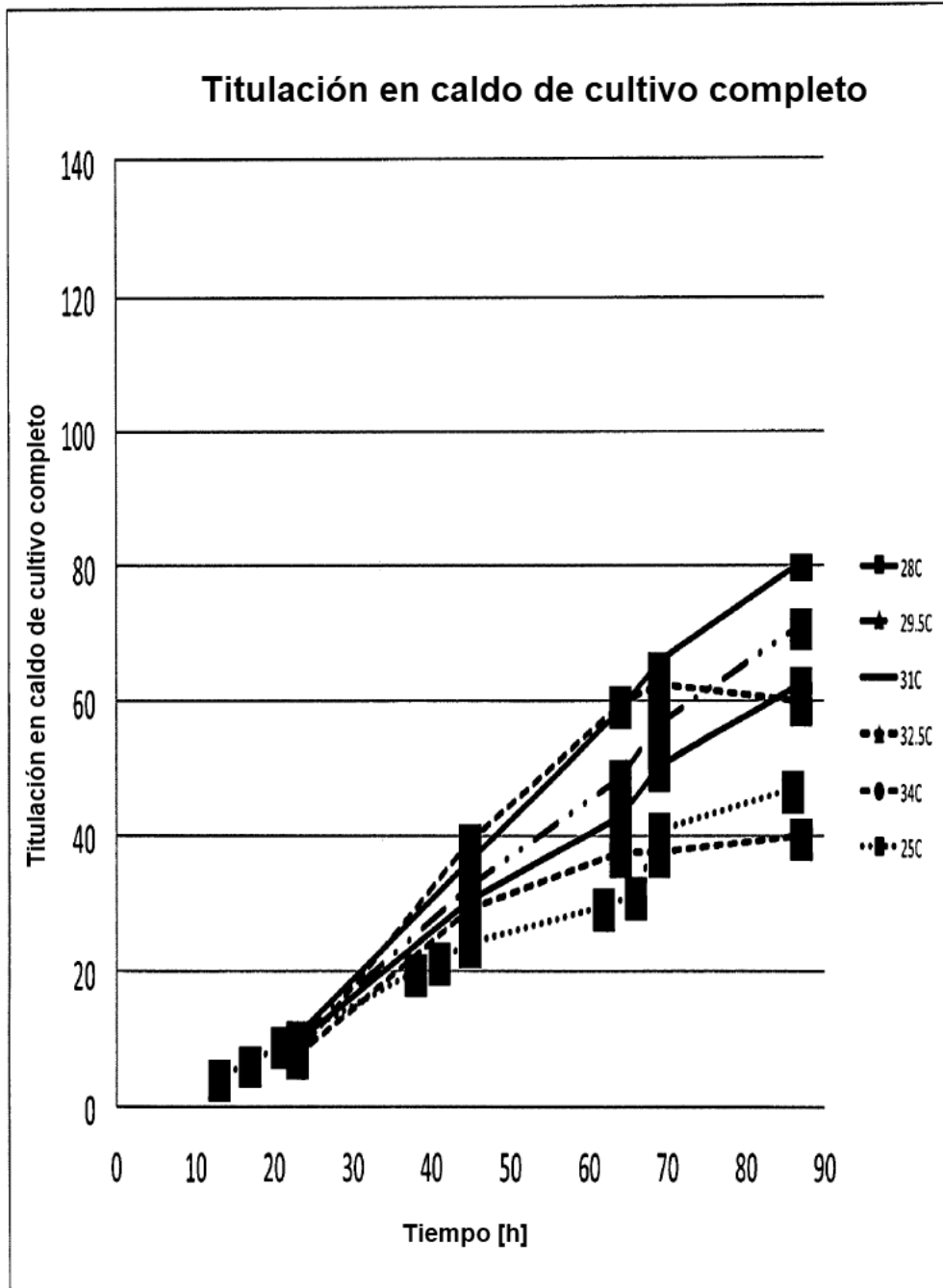


FIG. 41. Pureza de anticuerpo (Ab-A)

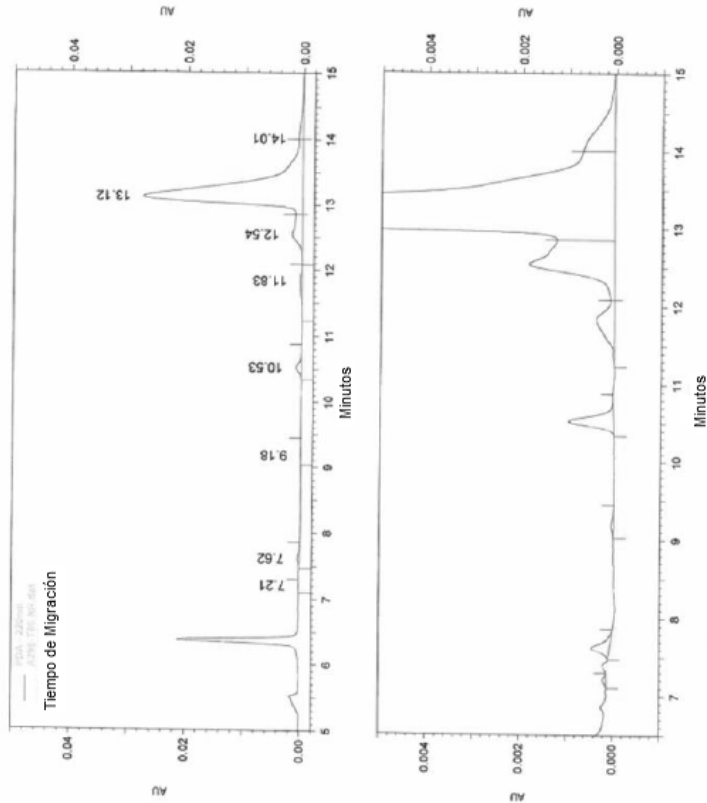
A. No reductoras

Temp C	Pico principal de			Total
	IgG	Prepico HHL	75kD HL	
25	86.3	7.1	1.7	95.1
28	89.0	6.8	1.7	97.5
29.5	88.7	6.8	1.8	97.3
31	88.0	7.5	1.6	97.1
32,5	70.4	7.3	16.3	94.0
34	73.8	7.1	15.0	95.9

B. reductoras

Temp C	HC	LC	RT 9.80	RT 10.16	RT 10.80	Total HC+LC
25	58.2	31.4	1.22	1.08	6.82	89.6
28	59.1	33.0	1.33	1.62	4.30	92.1
29.5	58.2	33.6	1.41	1.45	4.12	91.8
31	62.5	33.3	0.92	0.72	1.95	95.8
32,5	64.0	31.6	0.50	0.23	2.15	95.6
34	64.3	31.8	0.42	0.11	2.07	96.1

Fig. 42A. Cambio de temperatura de Ab-A a 25° C



PDA - Resultados 220 nm

Tempo de Migración	Altura	Area Corr.	PM	Area Corr.
7.21	75.00	17.11	13.8690	0.11
7.62	388.00	140.70	22.8300	0.87
9.18	63.00	22.42	57.0290	0.14
10.53	962.00	272.18	86.6560	1.69
11.83	387.00	244.51	115.3690	1.52
12.54	1831.00	1142.67	130.9140	7.09
13.12	27504.00	13912.96	143.5330	86.32
14.01	677.00	364.54	163.1010	2.26
Totales		16117.09		100.00

Fig. 42B. Cambio de temperatura de Ab-A a 25° C

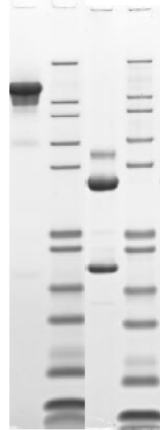


Fig. 42C. Cambio de temperatura de Ab-A a 25° C

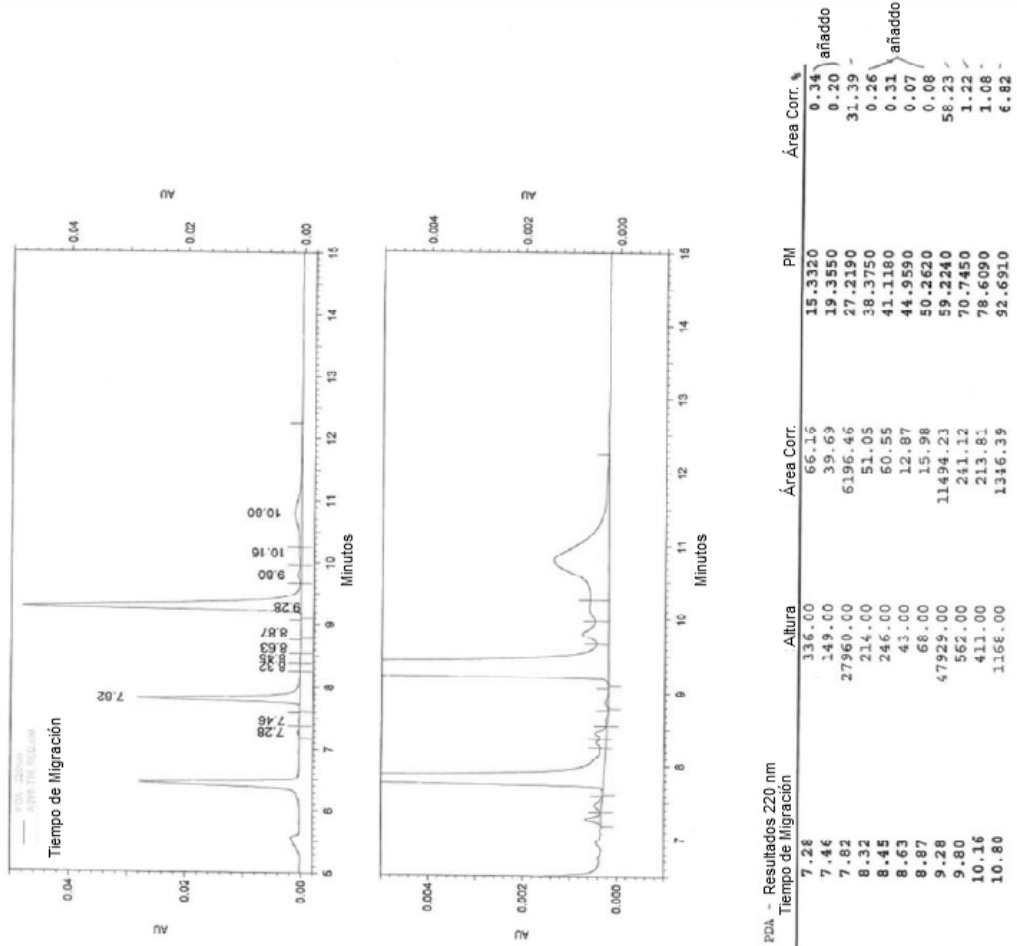
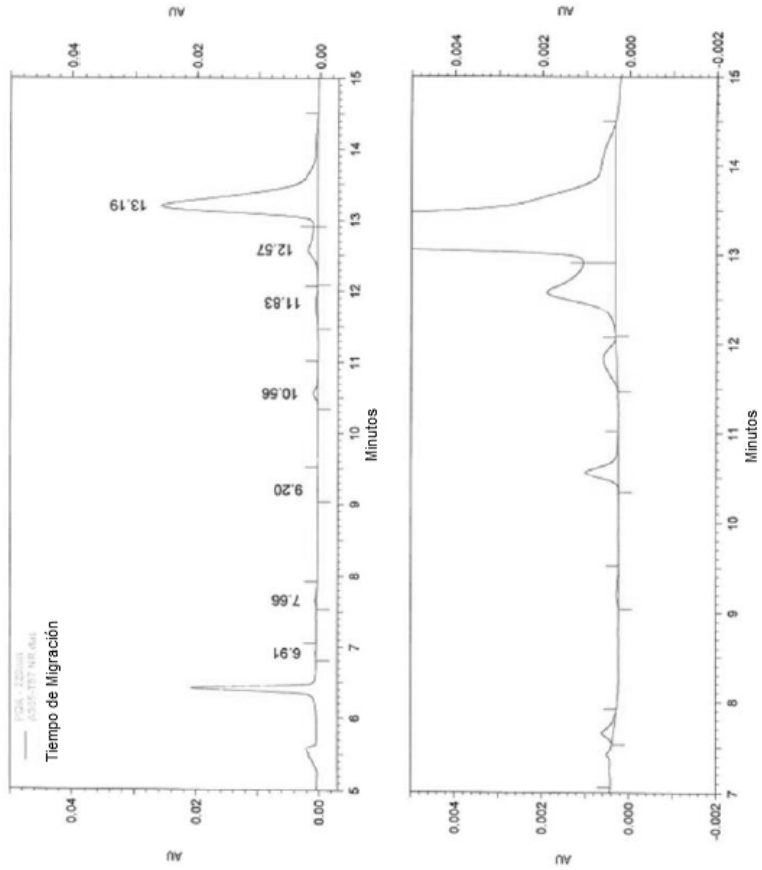


Fig. 43A. Ab-A mantenido a 28° C (sin cambio)



PDA - Resultados 220 nm			
Tempo de Migración	Altura	Área Corr.	PM
6.91	102.00	25.33	6.2750
7.66	256.00	91.58	22.9190
9.20	55.00	28.66	57.1340
10.56	756.00	223.99	87.2790
11.83	302.00	159.75	115.5750
12.57	1567.00	883.18	132.0350
13.19	25371.00	11475.35	145.7210
Totales		12887.84	100.00

Fig. 43B. Ab-A mantenido a 28° C (sin cambio)

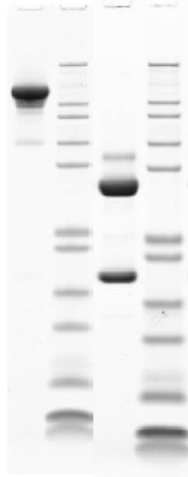


Fig. 43C. Ab-A mantenido a 28° C (sin cambio)

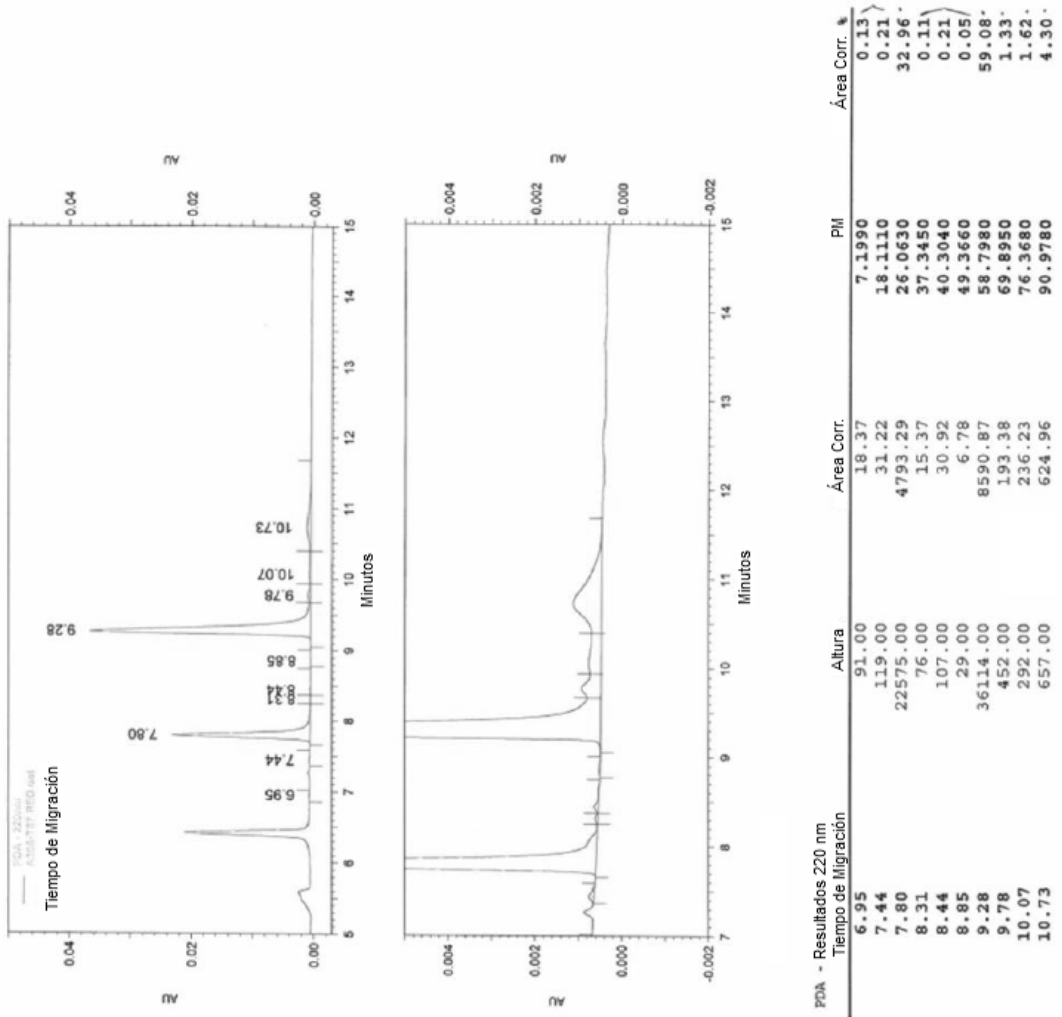
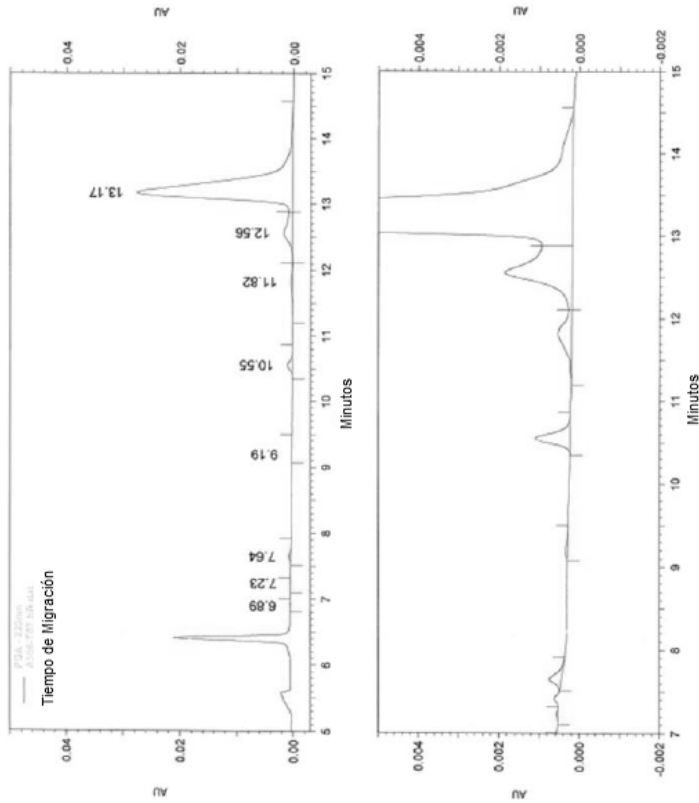


FIG. 44A. Cambio de temperatura de Ab-A a 29,5° C



PDA - Resultados 220 nm

Tiempo de Migración	Altura	Área Corr.	PM	Área Corr. %
6.89	71.00	17.70	5.9050	0.13
7.23	33.00	7.79	13.4870	0.06
7.64	298.00	104.78	22.5500	0.76
9.19	54.00	21.25	56.9490	0.15
10.55	878.00	242.53	87.0940	1.76
11.82	341.00	215.35	115.2060	1.56
12.56	1666.00	946.94	131.6650	6.85
13.17	27470.00	12259.04	145.1660	88.73
Totales		13815.37		100.00

FIG. 44B. Cambio de temperatura de Ab-A a 29,5° C

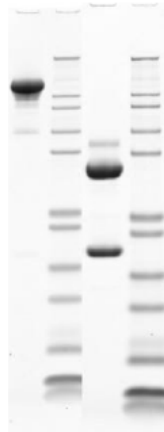


FIG. 44C. Cambio de temperatura de Ab-A a 29,5° C

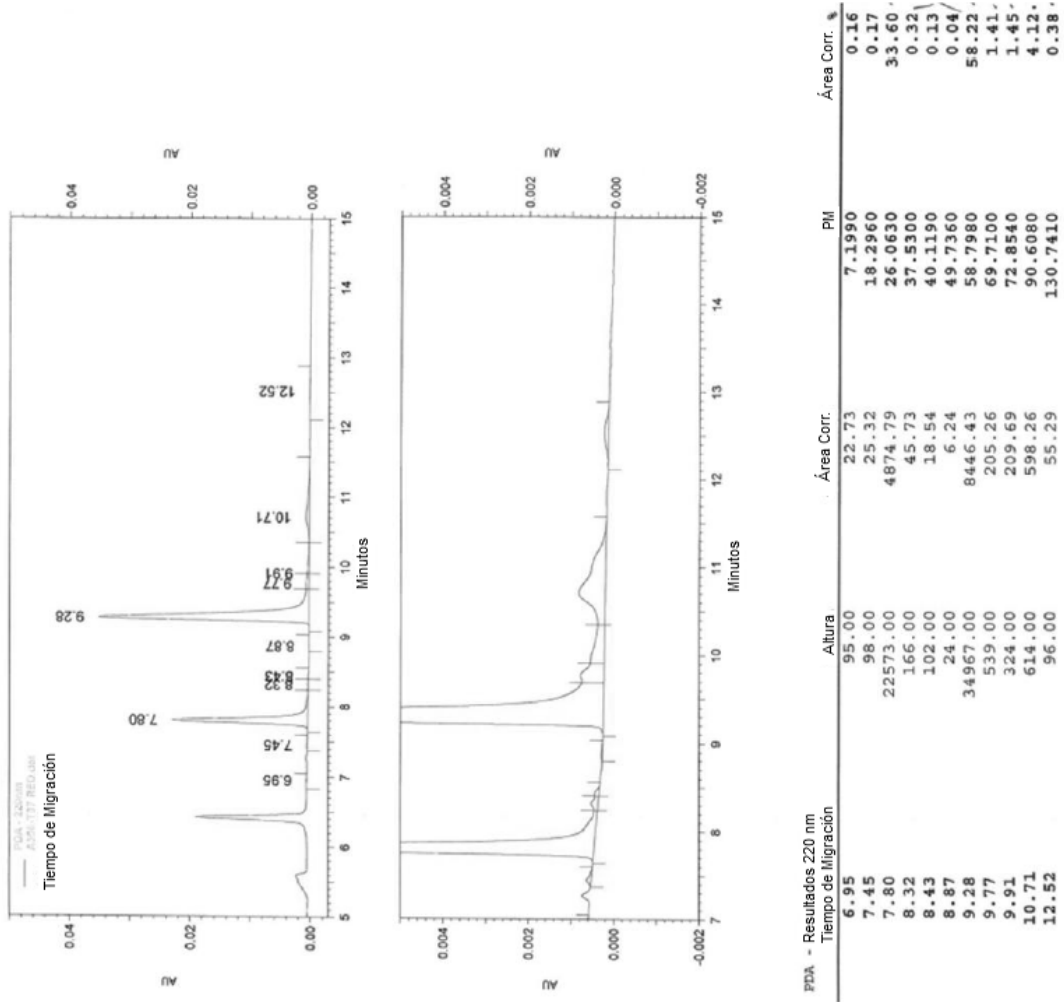
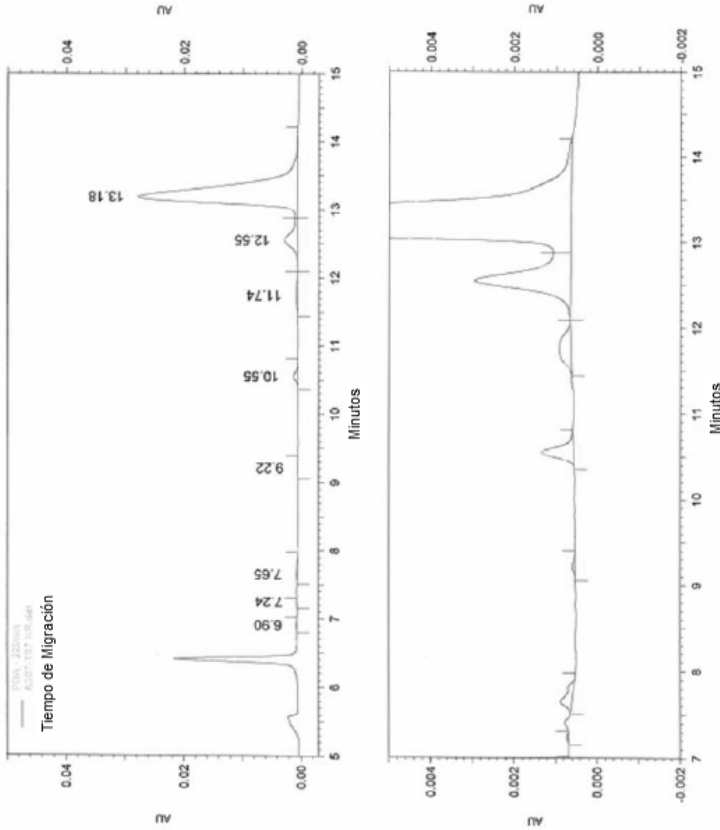


FIG. 45A. Cambio de temperatura de Ab-A a 31° C



PDA - Resultados 220 nm

Tiempo de Migración	Altura	Área Corr.	PM	Área Corr. %
6.90	187.00	41.64	6.0900	0.32
7.24	41.00	8.29	13.6720	0.06
7.65	272.00	133.81	22.7350	1.04
9.22	73.00	22.86	57.5040	0.18
10.55	775.00	209.42	87.0940	1.63
11.74	281.00	168.03	113.5410	1.31
12.55	2291.00	957.95	131.4600	7.47
13.18	27176.00	11284.35	145.5360	87.98
Totales		12826.35		100.00

FIG. 45B. Cambio de temperatura de Ab-A a 31° C

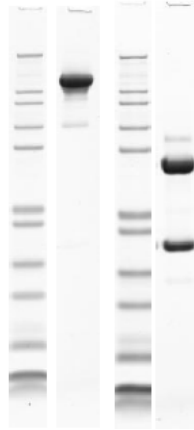


FIG. 45C. Cambio de temperatura de Ab-A a 31° C

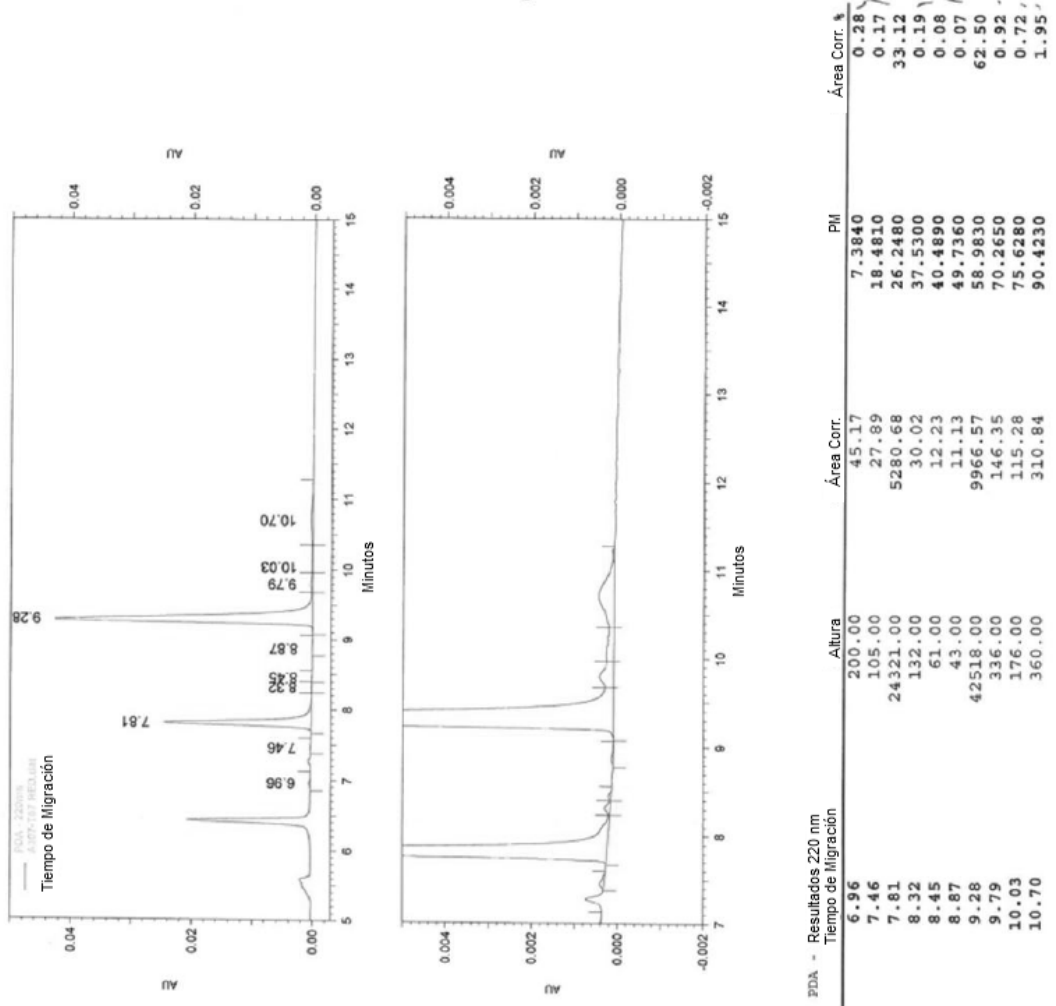
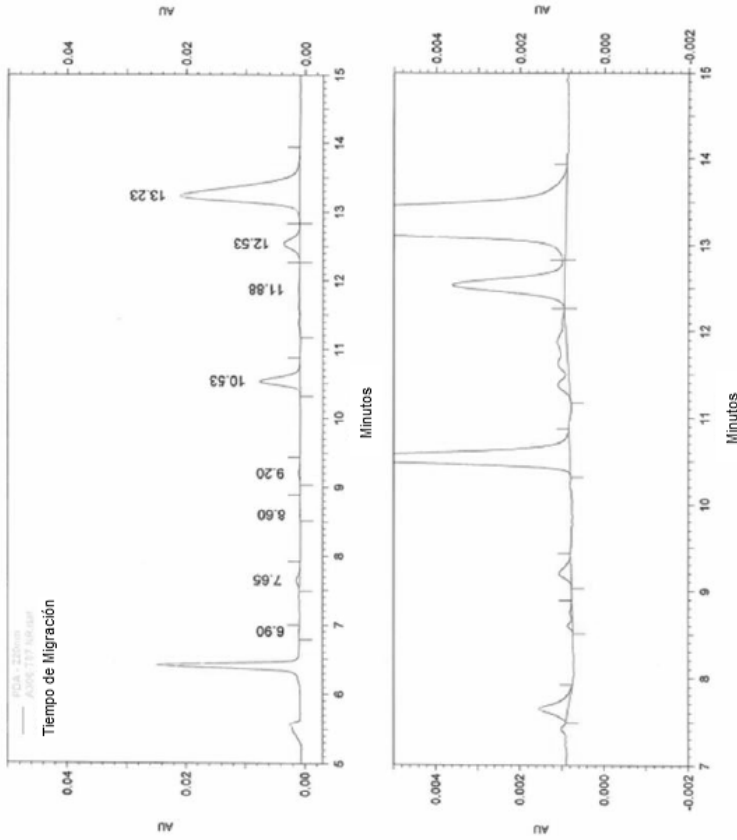


FIG. 46A. Cambio de temperatura de Ab-A a 32,5° C



PDA - Resultados 220 nm

Tempo de Migración	Altura	Área Corr.	PII	Área Corr. %
6.90	110.00	27.10	6.0900	0.25
7.65	687.00	255.34	22.7350	2.37
8.60	111.00	31.86	43.8180	0.30
9.20	280.00	90.07	57.1340	0.83
10.53	6788.00	1759.15	86.7240	16.30
11.88	223.00	245.22	116.5000	2.27
12.53	2665.00	785.45	131.1110	7.28
13.23	20119.00	7600.18	146.6460	70.41
Totales		10794.37		100.00

FIG. 46B. Cambio de temperatura de Ab-A a 32,5° C

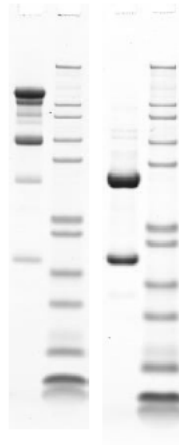
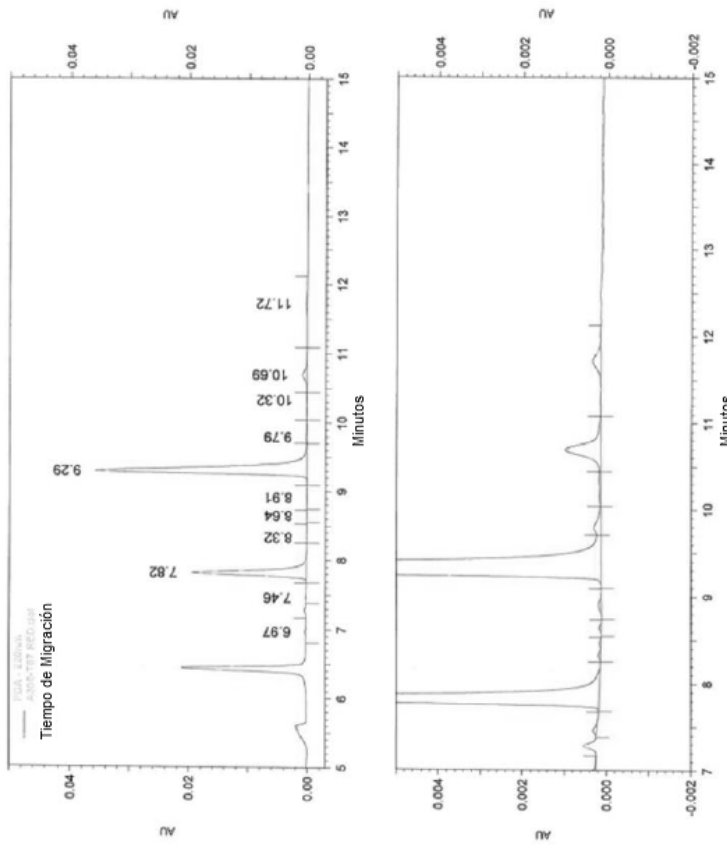


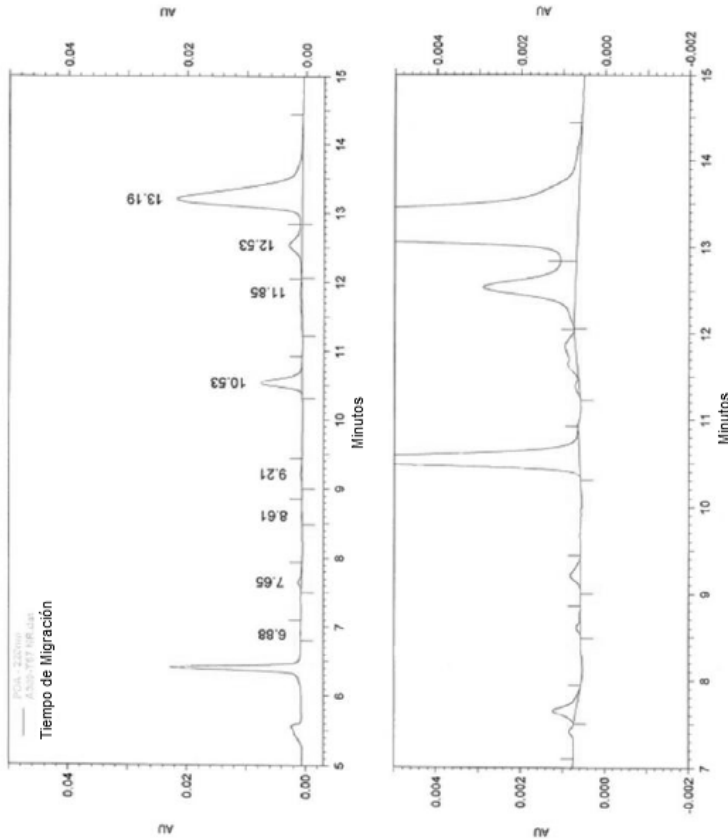
FIG. 46C. Cambio de temperatura de Ab-A a 32,5° C



FDA - Resultados 220 nm

Tiempo de Migración	Altura	Área Corr.	PII	Área Corr. %
6.97	151.00	48.28	7.5690	0.38
7.46	95.00	24.09	18.4810	0.19
7.82	19330.00	4068.27	26.4330	31.61
8.32	48.00	16.26	37.7150	0.13
8.64	53.00	9.10	44.7430	0.07
8.91	64.00	20.21	50.6610	0.16
9.29	35646.00	8229.99	59.1680	63.95
9.79	173.00	64.37	70.2650	0.50
10.32	49.00	29.73	82.1010	0.23
10.69	841.00	276.54	90.2380	2.15
11.72	204.00	83.02	112.9860	0.65

FIG. 47A. Cambio de temperatura de Ab-A a 34° C



FIDA - Resultados 220 nm		Área Corr.		PM		Área Corr. %	
Tiempo de Migración	Altura	Área Corr.	PM	Área Corr. %	Tiempo de Migración	Altura	Área Corr. %
6.88	76.00	26.34	5.7200	0.21	6.88	76.00	0.21
7.65	552.00	191.20	22.7350	1.53	7.65	552.00	1.53
8.61	103.00	27.69	44.0030	0.22	8.61	103.00	0.22
9.21	246.00	88.69	57.3190	0.71	9.21	246.00	0.71
10.53	7037.00	1883.73	86.7240	15.04	10.53	7037.00	15.04
11.85	246.00	173.19	115.9450	1.38	11.85	246.00	1.38
12.53	2185.00	894.52	131.1110	7.14	12.53	2185.00	7.14
13.19	21120.00	9238.84	145.7210	73.77	13.19	21120.00	73.77
Totales		12524.20		100.00			

FIG. 47B. Cambio de temperatura de Ab-A a 34° C

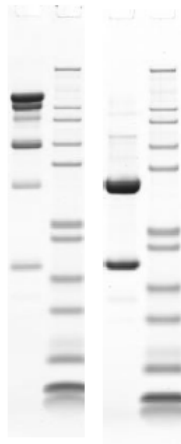


FIG. 47C. Cambio de temperatura de Ab-A a 34° C

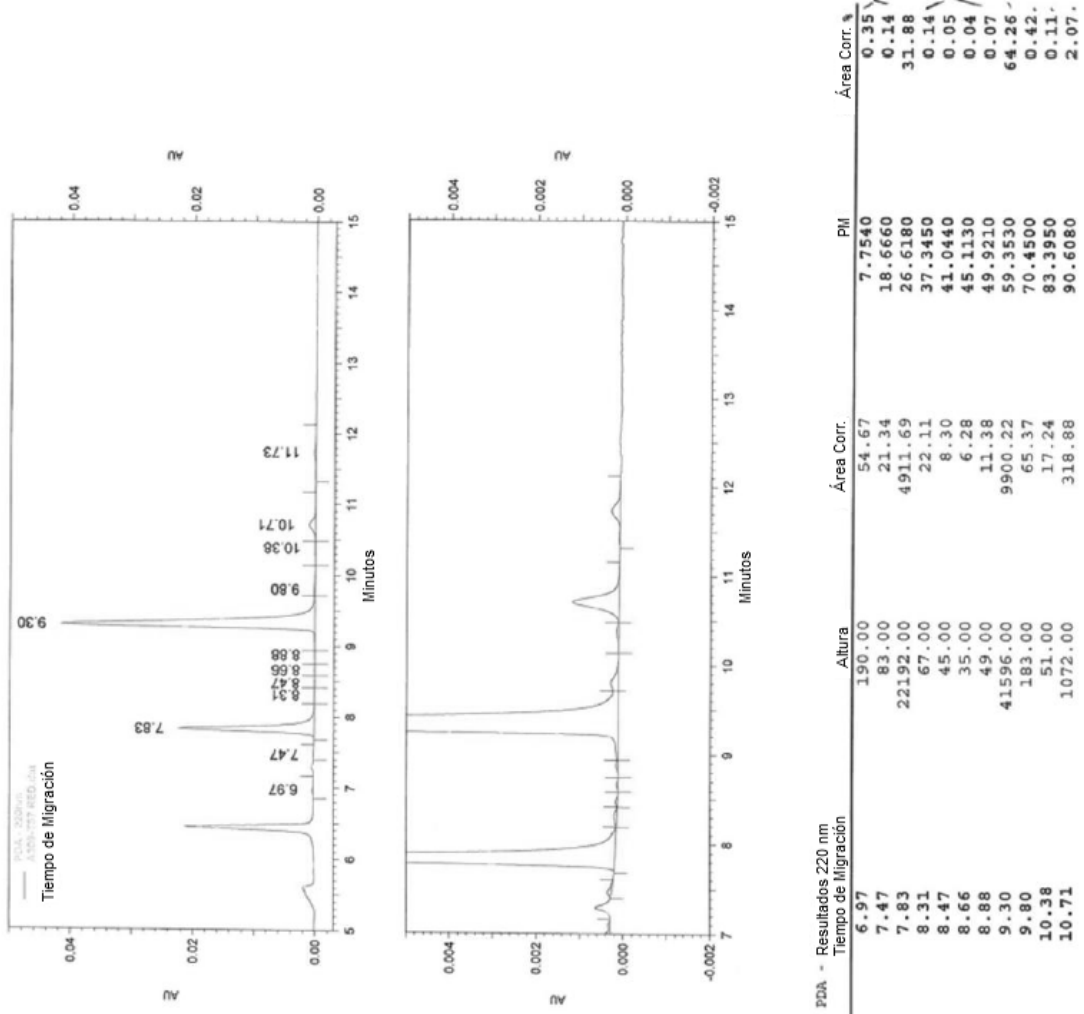


FIG. 48. La titulación de Ab aumenta por el cambio de temperatura

A. Cepa de mayor expresión (H4/L3)

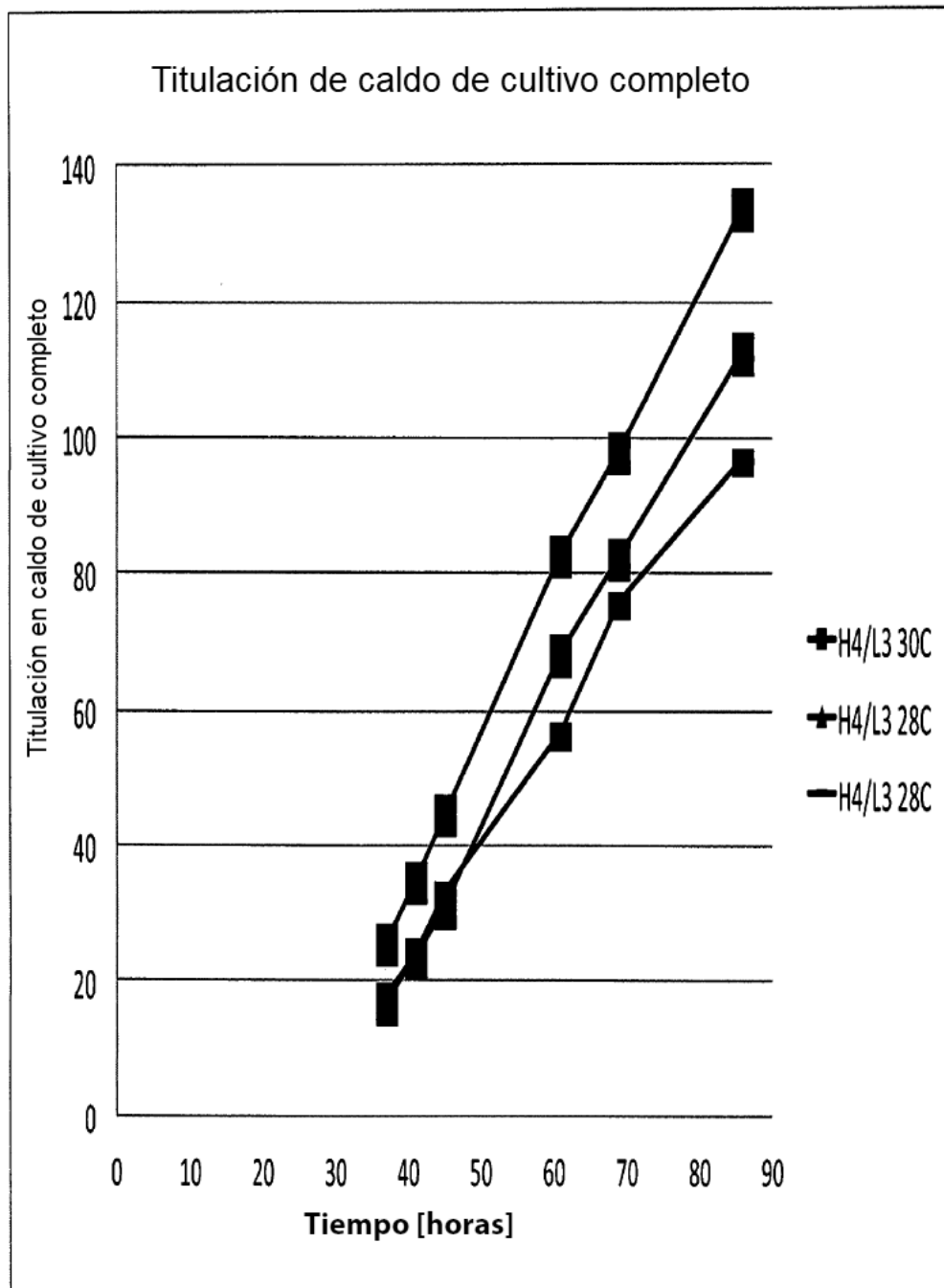


FIG. 48. La titulación de Ab aumenta por el cambio de temperatura
 B. Cepa de menor expresión (H3/L3)

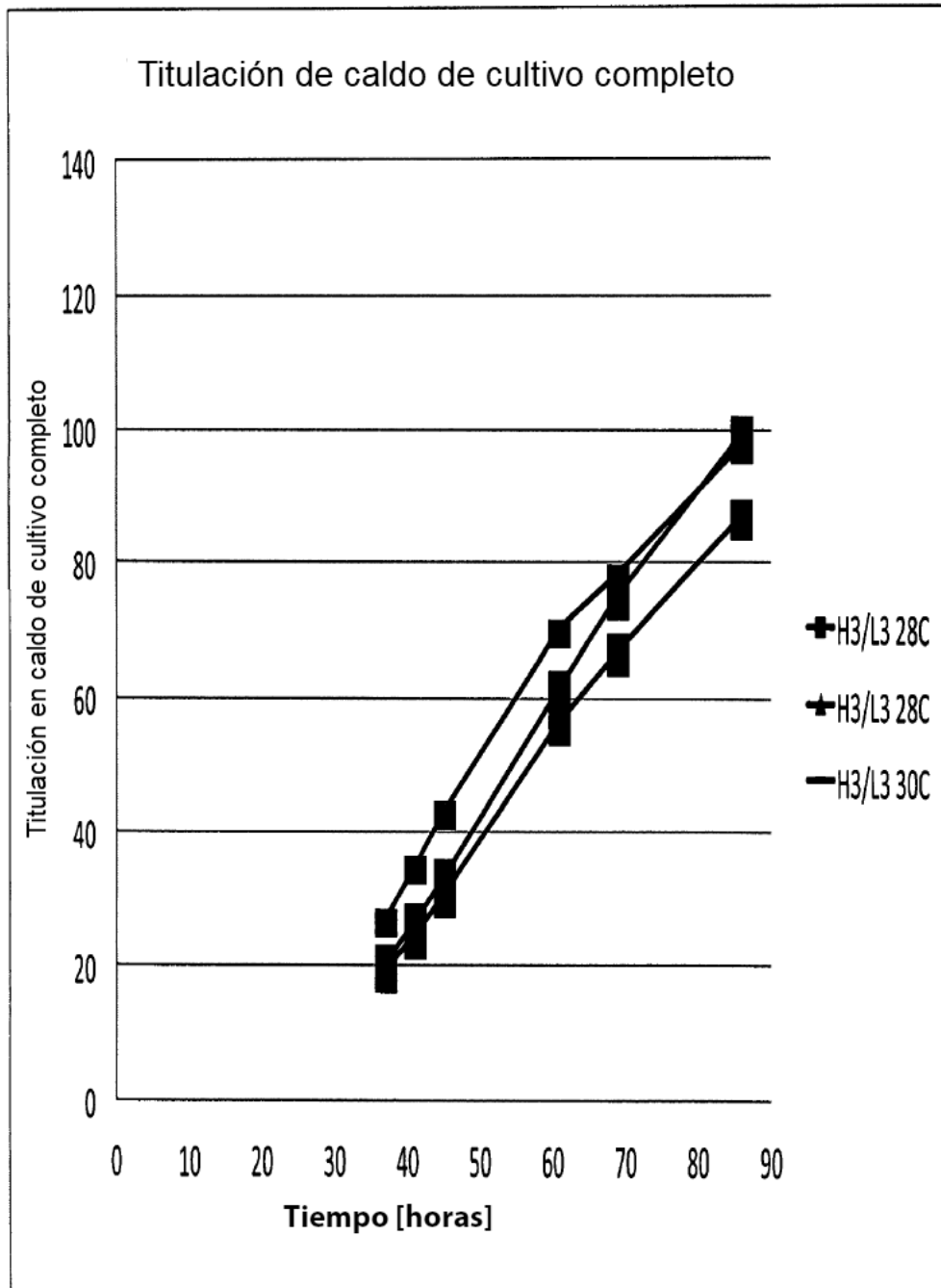


FIG. 49. Pureza de anticuerpo (Ab-B)

No reductoras						
Temp C	Pico principal			Total		
	de IgG	Prepico HHL	75kD HL			
28	89.34	3.27	1.52			94.13
28	76.25	7.35	8.00			91.60
30	91.63	2.94	1.44			96.01
30	83.44	4.75	6.15			94.34
28	87.72	3.60	2.15			93.47
28	61.05	4.92	23.14			89.11

reductoras						
Temp C	HC	LC	RT 10.15	RT 10.60	RT 11.08	Total HC/LC
28	67.67	29.58	0.90	0.00	0.55	97.25
28	63.75	30.62	0.69	0.00	0.53	94.37
30	67.91	29.83	0.82	0.00	0.42	97.74
30	67.20	29.55	1.04	0.00	0.57	96.75
28	67.66	29.50	0.85	0.00	0.71	97.16
28	65.42	29.64	0.89	0.00	0.89	95.06

FIG. 50. La titulación de Ab aumenta por el cambio de temperatura

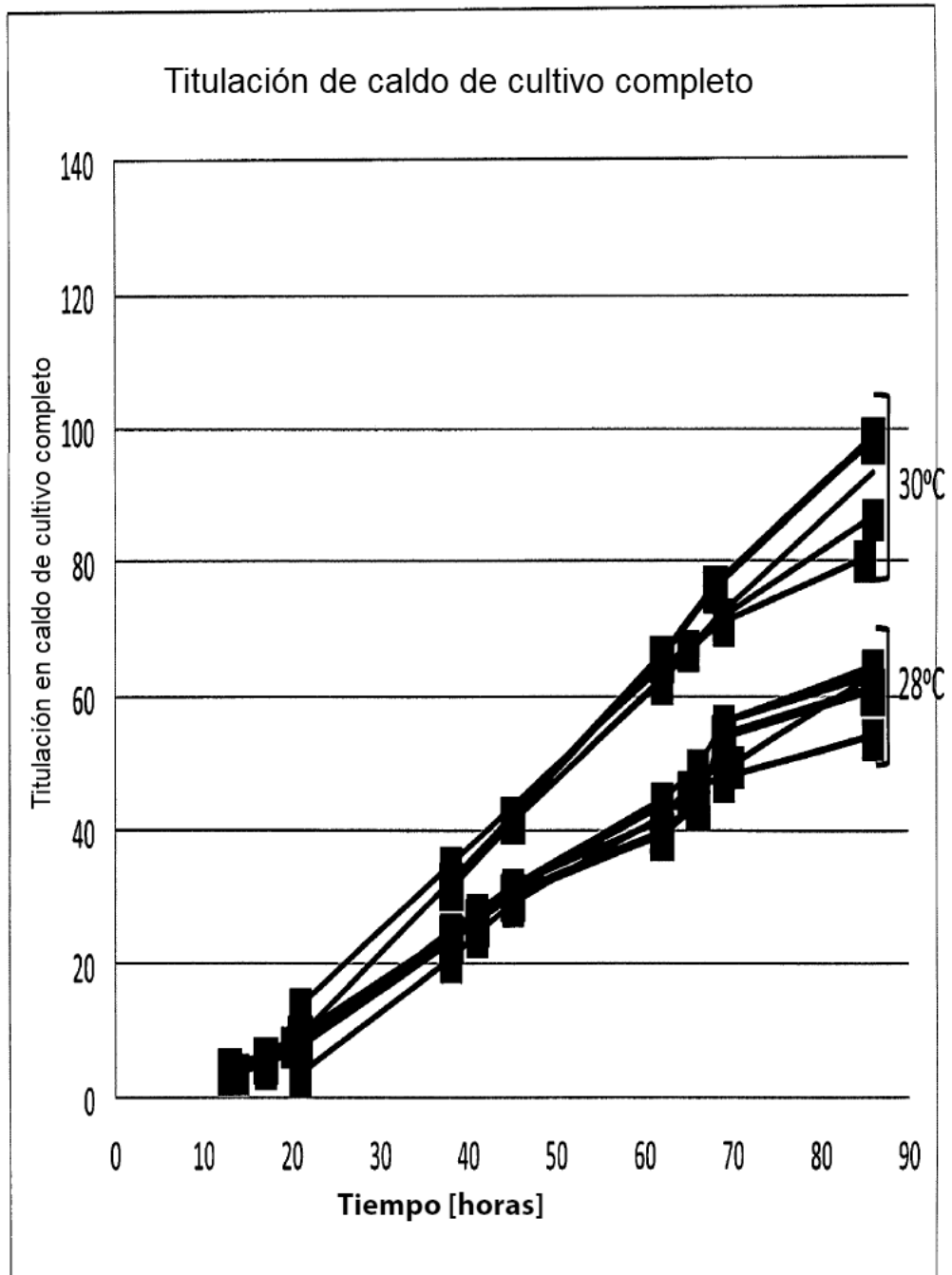


FIG. 51. Pureza de Ab-A

No reductoras					
Temp C	Pico principal de IgG	Prepico HHL	75kD HL	Total	
28	85.64	8.23	1.54	95.41	
28	84.97	7.9	1.55	94.42	
28	85.87	7.63	1.63	95.13	
28	85.75	7.96	1.5	95.21	
28	85.96	7.52	1.84	95.32	
30	87.88	6.71	1.69	96.28	
30	86.64	7.07	1.79	95.5	
30	89.54	5.12	2.55	97.21	
30	86.56	6.02	4.1	96.68	

reductoras						
Temp C	HC	LC	RT 9.80	RT 10.16	RT 10.80	Total HC/LC
28	60.88	32.23	0.96	1.02	2.69	93.11
28	60.31	32.21	1.06	1.26	3.78	92.52
28	59.24	31.53	1.21	1.57	5.18	90.77
28	59.47	32.05	1.11	1.37	4.79	91.52
28	60.05	31.69	1.16	1.27	4.5	91.74
30	63.8	31.75	0.84	0.76	1.97	95.55
30	64.47	32.04	0.8	0.61	0.89	96.51
30	66.52	31.26	0.79	0	0.97	97.78
30	66.33	31.09	0.83	0	1.24	97.42

FIG. 52

