(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 751 735**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014** **E 17187867 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 3299378**

(54) Título: **Métodos de replegado de proteínas a elevado pH**

(30) Prioridad:

12.02.2013 US 201361763664 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2020

(73) Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

(72) Inventor/es:

HOLLANDER, CRISTOPHER y
BLUM, BENJAMIN C.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 751 735 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de replegado de proteínas a elevado pH

Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional 61/763.664, presentada el 12 de febrero de 2013.

Antecedentes

El esqueleto de un anticuerpo, conocido como la región Fc, es responsable de las propiedades farmacocinéticas que pueden ser deseables en el caso de muchos productos biológicos terapéuticos (Jeffries, B. Biotechnol Prog. 2005; 21: 11-16). El tamaño de la región Fc la hace resistente a la filtración renal y a la unión al Receptor Neonatal Fc (FcRn), lo que le permite escapar de la degradación endosómica mediante un mecanismo de reciclado. Además de la región Fc, que está presente en los productos terapéuticos de anticuerpos monoclonales, existen productos de fusión Fc que están siendo investigados y desarrollados (Hakim et al. Mabs. 2009; 1: 281-287). Las fusiones de Fc son la fusión de una región Fc con otra proteína, péptido o principio activo (API). La fusión Fc tiene, por lo tanto, tanto las propiedades de la región Fc como las propiedades terapéuticas del API.

Existen muchas líneas celulares que son susceptibles de ser usadas para la elaboración de productos biológicos terapéuticos (Jung et al. Curr Opin Biotechnol. 2011; 22:1-10). Las líneas celulares de mamífero de ovario de hámster chino (CHO), de insecto Sf9, de levadura S. *cereviae* y bacteriana *E. coli* son algunas de las más habituales que son analizadas para la producción de proteínas recombinantes. Hasta ahora se han usado las de levadura, las de CHO y las de *E. coli* para la elaboración de productos biológicos terapéuticos que contienen una Fc, incluyendo un gran número de anticuerpos monoclonales. La expresión en *E. coli* ofrece tres potenciales y significativas ventajas con respecto a la expresión en otras líneas celulares: el tiempo de desarrollo de la línea celular es mucho más corto; las series del biorreactor son hasta 7 veces más cortas, lo que da como resultado una menor inversión de capital; y no hay necesidad de controlar la glicosilación aberrante que puede producirse en los cultivos con células de levadura y de mamífero.

La expresión de proteínas más grandes, como las fusiones de Fc, en *E. coli*, pueden suponer un reto excepcional. *E. coli* carece de las proteínas chaperonas y de otra maquinaria de replegado que se encuentra en un sistema de expresión eucariota. El citoplasma de *E. coli* es también un entorno reductor, que no es favorable para la formación de puentes de disulfuro. La región Fc de los anticuerpos IgG1 humanos contiene seis puentes de disulfuro. Dos puentes de disulfuro en la región de bisagra unen dos cadenas peptídicas para formar la molécula homodímera, y hay dos puentes de disulfuro más en cada una de las cadenas peptídicas. *E. coli* también puede tener un mecanismo para impedir que las proteínas no plegadas interfieran en los procesos normales de la célula. La proteína no plegada es desviada y aislada en agregados insolubles, denominados cuerpos de inclusión (CI), que pueden ser aislados a continuación en la fracción insoluble después de la lisis celular. Alternativamente, cuando se ralentiza la tasa de producción de la proteína recombinante para permitir que la proteína se pliegue, puede añadirse una secuencia líder para dirigir la proteína soluble que es expresada al espacio periplásmico. El periplasma es un entorno oxidante favorable para la formación de puentes de disulfuro. Sin embargo, los niveles de expresión notificados de proteína recombinante en el periplasma siguen siendo bajos (Liu et al. Protein Expression Purif. 2008; 62: 15-20).

Por el contrario, se ha notificado que los niveles de expresión en *E. coli* en los CI es elevado. La expresión de la proteína en los CI también tiene las ventajas de una resistencia de la proteína frente a la degradación y una facilidad de aislamiento a partir de las células (Grune et al. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36: 2519-2530). Dado que un CI es un agregado insoluble, la restauración de la proteína de interés a su conformación biológicamente activa puede suponer un reto (Jungbauer et al. J Biotechnol. 2006; 587-596). Normalmente, es necesario un proceso para romper y solubilizar los CI. Después, la proteína debe ser renaturalizada, o replegada, en su conformación biológicamente activa minimizando las pérdidas debidas a la agregación y la precipitación. Los actuales procesos de replegado pueden ser específicos para una proteína dada, lo que requiere una cuidadosa optimización para cada caso. Muchos procesos de replegado requieren unas concentraciones de proteína muy baja, y consecuentemente unos volúmenes mayores para la operación. Esto es difícil debido a que se requiere una mayor cantidad de reactivos potencialmente caros. También existe un reto en el entorno de elaboración, donde existe un límite físico en el tamaño del recipiente que puede usarse para el replegado de las proteínas. Finalmente, en el caso de las fusiones de Fc, los procesos de replegado deben formar correctamente los seis puentes de disulfuro que existen en la forma nativa de la proteína.

Zhizhou Zhang et al, (Science in China Series C Life Sciences, (19970401), vol. 40, no. 2, páginas 169 - 175) describe el mecanismo de mejora de la renaturación de proquimosina mediante la solubilización de cuerpos de inclusión a pH alcalino.

Sumario

La invención reivindicada se refiere a métodos para el replegado de una proteína desnaturalizada, que comprenden

(i) suspender los cuerpos de inclusión que comprenden una proteína desnaturalizada en una solución en suspensión para obtener una composición que comprende proteínas desnaturalizadas suspendidas; (ii) combinar la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10,5 y 13, para obtener así una composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas; y (iii) combinar la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11, para obtener así una composición que comprende proteínas replegadas, en donde el método no incluye el uso de una cantidad significativa de un agente desnaturalizante. En algunos métodos, el método no incluye el uso de una cantidad significativa de un agente reductor. El pH del tampón de solubilización puede estar en el intervalo de pH de entre 11,5 y 12,8, tal como en el intervalo de pH de entre 12,0 y 12,6. El pH del tampón de replegado puede estar en el intervalo de pH de entre 10 y 10,6, tal como en el intervalo de pH de entre 10,3 y 10,5. La solución en suspensión puede consistir en agua. La composición que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada puede tener un pH en el intervalo de entre 11 y 13, tal como un pH en el intervalo de pH de entre 11,5 y 12,8, por ejemplo, un pH de entre 12,0 y 12,6. La composición que comprende la proteína replegada puede tener un pH en el intervalo de entre 10 y 11, tal como en el intervalo de entre 10 y 10,6, por ejemplo, un pH de entre 10,3 y 10,5.

Las proteínas desnaturalizadas puede estar suspendidas en la solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:1-3, por ejemplo, de aproximadamente 1:2. La solución en suspensión puede ser agua. La composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas puede ser combinada con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g; por ejemplo, peso antes de la adición de la solución en suspensión) de proteínas desnaturalizadas o volumen de la solución en suspensión (ml):volumen (ml) del tampón de solubilización de 1:10-30, tal como de aproximadamente 1:20. La composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede ser combinada con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:1-5, tal como de aproximadamente 1:3-4.

En los métodos descritos en el presente documento, las proteínas desnaturalizadas puede estar suspendidas en la solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:1-3; la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas puede ser combinada con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30; y la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede ser combinada con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:1-5. El tampón de solubilización puede tener un pH en el intervalo de entre 11,5 y 12,8, y el tampón de replegado puede tener un pH en el intervalo de entre 10 y 10,9. Las proteínas desnaturalizadas pueden estar suspendidas en la solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de aproximadamente 1:2; la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas puede ser combinada con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de aproximadamente 1:20; y la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede ser combinada con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de aproximadamente 1:3-4. Las proteínas desnaturalizadas pueden estar suspendidas en agua en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de aproximadamente 1:2; la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas puede ser combinada con un tampón de solubilización que tiene un pH de aproximadamente 12,2 en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de aproximadamente 1:20; y la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede ser combinada con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 10,2 y 10,6 en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de aproximadamente 1:3-4.

En los métodos descritos en el presente documento, las proteínas desnaturalizadas suspendidas y el tampón de solubilización pueden combinarse durante 1-10, por ejemplo, 2-5, minutos antes de ser combinadas con el tampón de replegado. La composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede ser combinada con el tampón de replegado durante 5-60, por ejemplo, 15-25, minutos.

En los métodos descritos en el presente documento, el pH de la solución que comprende las proteínas replegadas puede ser reducido después del replegado.

En los métodos descritos en el presente documento, el tampón de solubilización y/o el tampón de replegado pueden comprender arginina. El tampón de replegado puede comprender un agente oxidante, por ejemplo, glutatión, en el que, por ejemplo, el glutatión está en una proporción entre oxidado:reducido de aproximadamente 5:1.

En ciertas realizaciones, el método no comprende suspender en primer lugar la proteína desnaturalizada en una solución en suspensión. En ciertas realizaciones, el método no incluye el uso de un agente desnaturalizante. Las proteínas desnaturalizadas pueden estar en forma de cuerpos de inclusión (CI). La proteína que es renaturalizada según los métodos descritos en el presente documento puede comprender al menos una cisteína. La proteína puede comprender al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en la proteína nativa. La proteína puede

comprender una región Fc, que puede comprender una bisagra. La proteína puede comprender un dominio de unión que se une específicamente a una proteína objetivo. El dominio de unión puede ser un dominio de unión de soporte alternativo, tal como un dominio de soporte basado en fibronectina, por ejemplo, un dominio ^{10}FN3. En ciertas realizaciones, la proteína comprende una proteína ^{10}FN3 y una región Fc que comprende una bisagra, un dominio CH2 y un CH3.

También se proporcionan en el presente documento composiciones, por ejemplo, composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y agua, en las que la composición no comprende un tampón o un agente desnaturalizante. También se proporcionan composiciones que comprenden una suspensión de proteínas desnaturalizadas, en las que al menos algunas proteínas comprenden al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y en las que la composición no comprende un tampón o un agente desnaturalizante. También se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10 y 13, en las que la composición no comprende un agente desnaturalizante. Adicionalmente se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11 y un agente oxidante, en las que la composición no comprende un agente reductor distinto a un agente reductor que parte de un agente oxidante que está presente en la composición. La proteína puede comprender una región Fc o una porción de la misma. La proteína puede comprender un dominio de unión, por ejemplo, un dominio FBS, por ejemplo, un dominio ^{10}Fn3. El dominio ^{10}Fn3 puede unirse específicamente a un objetivo, y el dominio ^{10}Fn3 puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 50 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29. La proteína puede estar presente en la composición a una concentración de al menos 5 mg/ml o 10 mg/ml.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama que muestra ejemplos de etapas para el replegado de una proteína desnaturalizada.

Las Figuras 2 A-C muestran los resultados del uso de un método de intercambio de tampón G25 para estimar la eficacia de replegado. A) El replegado con G25 se llevó a cabo con Tris 50 mM a un pH de 8,5 y arginina 0,4 M. B) El replegado con G25 se llevó a cabo con Tris 50 mM a un pH de 9,0 y arginina 0,4 M. C) El replegado con G25 se llevó a cabo con Tris 50 mM a un pH de 10,4 y arginina 0,4 M.

Las Figuras 3A y B muestran la concentración del agregado soluble visualizado mediante una SDS-PAGE. El análisis de la SDS PAGE de los replegados de G25 llevado a cabo a un pH de 9,0 (A) y a un pH de 10,4 (B).

La Figura 4 muestra los geles de la SDS-PAGE de las reacciones de replegado con G25 incubados durante 30 minutos (A) o 4 horas (B) en ausencia de TCEP antes de la carga en la SDS-PAGE.

La Figura 5 muestra la eficacia en la formación del dímero después de unos periodos de incubación de replegado de 0, 1 y 2 horas antes de la adición *redox*. "Dil" se refiere a la menor concentración de ^{10}Fn3/Fc con respecto a la concentración de las muestras denominadas "puras".

Las Figuras 6A y B muestran el dicroísmo circular (DC) en UV próximo y lejano de la ^{10}Fn3/Fc en diferentes condiciones. La Figura 6A muestra el DC en UV próximo que representa la estructura terciaria de la proteína a unos pH variables o en presencia de guanidina. La Figura 6B muestra el DC en UV lejano que representa la estructura secundaria de la proteína a unos pH variables y en presencia de guanidina.

La Figura 7 muestra la solubilización a un elevado pH para el replegado de la ^{10}Fn3/Fc a 1,75, 3,5 y 7 mg/ml, bien con una carga de 10 µg (carriles 1-4) o bien una carga de 20 µg (carriles 5-7).

Las Figuras 8A y B muestran los datos de unión de SPR de la proteína ^{10}Fn3/Fc (A) expresada en mamífero, y (B) expresada en *E. coli* y replegada. Las siguientes Tablas muestran los diagramas que proporcionan los valores de la ka, de la kd y de la KD para cada proteína.

La Figura 9 muestra el porcentaje de inhibición en ratones de la secreción de la citocina inducida por el objetivo mediante diversas cantidades de la expresada en *E. coli* y replegada, o la expresada en mamífero, la proteína ^{10}Fn3/Fc, lo que indica que se obtienen unos niveles de inhibición similares con la proteína expresada en *E. coli* y replegada con respecto a la proteína expresada en mamífero. "mpk" se refiere a miligramos de proteína por peso del animal en kg.

La Figura 10 muestra el porcentaje de inhibición en ratones de la secreción de la citocina inducida por el objetivo (diferente al de la Figura 9) mediante diversas cantidades de la proteína ^{10}Fn3/Fc expresada en *E. coli* y replegada ("E. *coli* replegada") o de la proteína ^{10}Fn3/Fc expresada en células de mamífero en un cultivo en matraz agitado ("matraz agitado de mamífero) o en un biorreactor ("biorreactor de mamífero"). También se muestra el porcentaje de inhibición obtenido con un anticuerpo ("anticuerpo BMS") que se une al mismo objetivo que uno de los objetivos de la molécula ^{10}Fn3/Fc, así como la inhibición mediante una de las dos entidades de la ^{10}Fn3 por sí misma ("mono-adnectina").

La Figura 11 muestra el porcentaje de inhibición en ratones de la traducción de señales mediante diversas cantidades de la proteína ^{10}Fn3/Fc expresada en *E. coli* y replegada ("E. *coli* replegada") o de la proteína ^{10}Fn3/Fc expresada en células de mamífero en un cultivo en matraz agitado ("matraz agitado de mamífero) o en un biorreactor ("biorreactor de mamífero"). También se muestra el porcentaje de inhibición obtenido con un anticuerpo ("anticuerpo BMS") que se une al mismo objetivo que uno de los objetivos de la molécula ^{10}Fn3/Fc.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos para el replegado de proteínas desnaturalizadas, tales como las proteínas presentes en forma de cuerpos de inclusión (CI). Los métodos son aplicables, por ejemplo, a las proteínas que comprenden al menos un puente de disulfuro, tales como las proteínas que comprenden una región Fc o un dominio (o porciones del mismo) de anticuerpos. Un método puede comprender la combinación de una composición que comprende proteínas desnaturalizadas o no plegadas con una composición que tiene un pH muy alcalino, seguido de una incubación a un pH y reducido. Al contrario que los métodos usados habitualmente para el replegado de proteínas, por ejemplo, a partir de CI, los métodos descritos en el presente documento no requieren el uso de un agente desnaturalizante o caotrópico. Además, los métodos descritos en el presente documento permiten el replegado de proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, a partir de CI, sin el uso de grandes volúmenes de tampón y generalmente en unos periodos de tiempo más cortos que los de los métodos actuales usados habitualmente.

Definiciones

Por "polipéptido" se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, la modificación post-traduccional o la función. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la Patente de EE.UU. nº 6.559.126. Los polipéptidos también pueden ser modificados mediante cualquiera de diversas formas químicas habituales (por ejemplo, un aminoácido puede estar modificado con un grupo protector; el aminoácido carboxi-terminal puede ser formado en un grupo amida terminal; el residuo amino-terminal puede ser modificado con grupos, por ejemplo, para aumentar la lipofilia; o el polipéptido puede ser glicosilado químicamente o modificado de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de los polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura, tal como un compuesto cíclico u otra molécula, al polipéptido, y también incluyen polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos con una configuración alterada (es decir, R o S; o, L o D).

Una "región" de un dominio ^{10}Fn3 (o fracción), según se usa en el presente documento, se refiere a un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), a una hebra β (A, B, C, D, E, F y G), al N-terminal (correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) o al C-terminal (correspondiente a los residuos de aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 1) del dominio ^{10}Fn3 humano que tiene la SEQ ID NO: 1.

Un "bucle del polo norte" se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un dominio humano de un décimo de tipo fibronectina 3 (^{10}Fn3).

Un "bucle del polo sur" se refiere a uno cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un dominio humano de un décimo de tipo fibronectina 3 (^{10}Fn3) dominio.

Una "región de soporte" se refiere a cualquier región que no es un bucle de un dominio ^{10}Fn3 humano. La región de soporte incluye las hebras β A, B, C, D, E, F y G, así como la región N-terminal (los aminoácidos correspondientes a los residuos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) y la región C-terminal (los aminoácidos correspondientes a los residuos 93-101 de la SEQ ID NO: 1).

El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" en el presente documento se define como el porcentaje de los residuos de aminoácidos de una secuencia candidato que son idénticos a los residuos de aminoácidos de una secuencia seleccionada, después de la alineación de las secuencias y de la introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación para el propósito de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están en la pericia de la materia, por ejemplo, usando un programa informático para ordenador disponible públicamente, tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la medición de la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para el propósito del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad en la secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc., ha sido presentado con documentación de usuario en la Copyright Office de Estados Unidos, Washington D. C., 20559, en la que se ha registrado con el nº de registro de la Copyright de Estados Unidos TXU510087, y está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. El programa ALIGN-2 debería ser compilado para su uso con un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para el propósito del presente documento, el % de identidad en las secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede formularse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue: 100 veces la fracción X/Y, en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de

alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Según se usa en el presente documento, se considera que un residuo de aminoácido en un polipéptido "contribuye a la unión" a un objetivo si (1) se encuentra que cualquiera de los átomos que no son hidrógeno de la cadena lateral o de la cadena principal del residuo está a cinco angstroms de cualquier átomo del objetivo de unión basado en una estructura tridimensional determinada experimentalmente del complejo, y/o (2) una mutación del residuo con respecto a su equivalente en la ^{10}Fn3 natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), a alanina, o a un residuo que tiene una cadena lateral con un tamaño similar o menor que el residuo en cuestión, da lugar a un aumento medido en la constante de disociación en equilibrio con respecto al objetivo (por ejemplo, un aumento en la k_{on}).

Una "fracción" se refiere a una porción de una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender varias fracciones. En una realización, una proteína de fusión comprende una fracción de soporte basada en fibronectina y una fracción de Fc. Una fracción de Fc puede comprender un dominio CH2 y un CH3, pero no comprende necesariamente una bisagra.

Una "proteína desnaturalizada" se refiere a una proteína que no está plegada adecuadamente (es decir, no tiene la conformación espacial o la estructura tridimensional adecuada). "Desnaturalización" se refiere a un proceso en el que se modifica la conformación activa de la proteína, pero la estructura primaria (cadena de aminoácidos, enlaces peptídicos) de la proteína permanece sin modificar. Para que sea capaz de llevar a cabo su función biológica, una proteína se pliega en una conformación espacial específica, por la acción de interacciones no covalentes tales como interacciones iónicas, fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno y un empaquetamiento hidrófobo. Una proteína que está desnaturalizada (es decir, que no está adecuadamente plegada) puede ser una proteína que no tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria adecuada. La estructura secundaria de una proteína o de un polipéptido se refiere a subestructuras locales muy irregulares, tales como la hélice alfa y la hebra beta o las láminas beta de una proteína. La estructura terciaria de una proteína o de un polipéptido se refiere a la estructura tridimensional de la molécula de proteína individual, en la que el plegado de las hélices alfa y de las láminas beta en un glóbulo compacto está guiado por interacciones hidrófobas no específicas (el enterramiento de residuos hidrófobos con respecto al agua), puentes salinos, puentes de hidrógeno y el estrecho empaquetamiento de las cadenas laterales y los puentes de disulfuro. La estructura cuaternaria de una proteína es la estructura tridimensional de las subunidades de una proteína multi-subunidad. Las subunidades de una proteína se mantienen unidas entre sí por los mismos enlaces que los que mantienen una estructura terciaria de una proteína. Los puentes de disulfuro contribuyen a la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína, de un polipéptido o de un polipéptido complejo. Una proteína desnaturalizada puede ser una proteína que contiene cisteínas, pero en la que no hay presentes puentes de disulfuro o se han formado incorrectamente. Las proteínas desnaturalizadas generalmente son insolubles y precipitan desde una solución. La presencia de uno o más puentes de disulfuro en una proteína generalmente hace que su renaturalización desde un estado desnaturalizado sea más difícil. La estructura de la proteína puede ser visualizada o determinada mediante diversas herramientas, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular y microscopía crioelectrónica.

Métodos para el replegado de proteínas desnaturalizadas

Cuando las proteínas son expresadas en ciertos sistemas de expresión, son producidas en una forma desnaturalizada y deben ser renaturalizadas, es decir, debe formarse de nuevo su estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria. Por ejemplo, las proteínas expresadas en grandes cantidades en *E. coli* son derivadas a cuerpos de inclusión (CI). Los CI están formados esencialmente por proteínas desnaturalizadas. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para renaturalizar proteínas no plegadas o plegadas inadecuadamente, por ejemplo, las presentes en los CI.

Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada puede comprender: (i) combinar la proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 13 para obtener así una composición que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada; y (ii) combinar la composición que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11 para obtener así una composición que comprende la proteína replegada. Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada puede comprender: (i) suspender la proteína desnaturalizada en una solución en suspensión para obtener una composición que comprende la proteína desnaturalizada suspendida; (ii) combinar la composición que comprende la proteína desnaturalizada suspendida con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 13 para obtener así una composición que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada; y (iii) combinar la composición que comprende la proteína desnaturalizada solubilizada, con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11 para obtener así una composición que comprende la proteína replegada. Cuando una proteína desnaturalizada es parte de un CI, un método para el replegado de la proteína puede comprender: (i) combinar los CI con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 13 para obtener así una composición que comprende los CI solubilizados; y (ii) combinar la composición que comprende los CI solubilizados con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11 para obtener así una

composición que comprende la proteína replegada. Un método para el replegado de una proteína puede comprender (i) suspender los CI que comprenden una proteína en una solución de CI en suspensión para obtener una composición que comprende los CI suspendidos; (ii) combinar la composición que comprende los CI suspendidos con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 13 para obtener así una composición que comprende los CI solubilizados; y (iii) combinar la composición que comprende los CI solubilizados con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11 para obtener así una composición que comprende la proteína replegada. En la Figura 1A se proporciona un diagrama que muestra ejemplos de etapas de replegado. La primera etapa del método puede estar eliminada.

Algunos de los métodos usados habitualmente para el replegado de proteínas desnaturalizadas conocidos en la materia usan agentes desnaturalizantes para solubilizar las proteínas desnaturalizadas. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento o en una o más de las composiciones, los tampones o las soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento no incluyen una cantidad significativa de un agente desnaturalizante. Algunos ejemplos de agentes desnaturalizantes (o caotrópicos) incluyen: guanidina (o guanidio), clorhidrato de guanidio, cloruro de guanidio, tiocianato de guanidio, urea, tiourea, perclorato de litio, cloruro de magnesio, fenol, betaína, sarcosina, carbamoil sarcosina, taurina, dimetilsulfóxido (DMSO); alcoholes tales como propanol, butanol y etanol; detergentes, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), N-lauroil sarcosina, iones bipolares, sulfobetaínas no detergentes (NDSB), TRITON™ X-100, NONIDET™ P-40, la serie TWEEN™ y la serie BRIJT™; hidróxidos tales como hidróxido de sodio potasio, y combinaciones de los mismos. Una cantidad "significativa" de un desnaturalizante se refiere a una cantidad del desnaturalizante que es suficiente para contribuir a la solubilización de la proteína desnaturalizada. Algunas concentraciones de desnaturalizantes desnaturalizan las proteínas, y estas concentraciones se conocen como "concentraciones desnaturalizantes". Algunas concentraciones de desnaturalizantes no desnaturalizan las proteínas, pero pueden contribuir a la solubilización de las proteínas, y estas concentraciones se conocen como "concentraciones no desnaturalizantes". Por ejemplo, el guanidio 6 M es una concentración desnaturalizante, mientras que a 1 M no es una concentración desnaturalizante. De forma análoga, unas concentraciones de urea de 1-2 M no son consideradas unas concentraciones desnaturalizantes. Una solución que comprende menos de una cantidad significativa de un desnaturalizante incluye soluciones que comprenden menos de una concentración desnaturalizante o no desnaturalizante de un desnaturalizante. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento preferentemente no incluyen urea ni guanidio a una concentración de 1 M o más. En ciertas realizaciones, unas cantidades menores de cualquier agente desnaturalizante que sean lo suficientemente bajas para que no contribuyan a la desnaturalización ni/o a la solubilización de una proteína desnaturalizada pueden estar presentes en cualquier momento en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en una o más de las composiciones, los tampones y las soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento. Según se define en el presente documento, cuando se hace referencia a métodos que no incluyen el uso de un agente desnaturalizante o de una cantidad significativa de un agente desnaturalizante, el agente que produce las condiciones alcalinas en el tampón de solubilización no se considera un agente desnaturalizante, o como alternativa, si se considera un agente desnaturalizante, entonces la afirmación pretende indicar que no se añade ni se usa otro agente desnaturalizante.

En ciertas realizaciones, una cantidad menor de un desnaturalizante es una cantidad de desnaturalizante que es lo suficientemente baja como para que su inclusión en un método de replegado no requiera una etapa adicional para reducir posteriormente su concentración ni eliminarlo de una solución. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento no incluyen una etapa de diálisis, por ejemplo, no incluyen una etapa de diálisis antes o después de cualquiera de las etapas de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, no se lleva a cabo ninguna diálisis antes, ni después, de la adición de la solución en suspensión, del tampón de solubilización o del tampón de replegado.

En ciertas realizaciones, la concentración de un agente desnaturalizante en los métodos descritos en el presente documento o en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento es menor de 1 M, de 100 mM, de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de 10^{-2} mM, de 10^{-3} mM, de 10^{-4} mM, de 10^{-5} mM o de 10^{-6} mM. En ciertas realizaciones, no se añade ningún agente desnaturalizante a, ni está presente en, una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente ningún agente desnaturalizante en ninguna etapa de los métodos descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la concentración de guanidio o de una sal o un análogo del mismo (por ejemplo, cloruro de guanidio, clorhidrato de guanidio y tiocianato de guanidio) en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento es menor de 1 M, de 100 mM, de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de 10^{-2} mM, de 10^{-3} mM, de 10^{-4} mM, de 10^{-5} mM o de 10^{-6} mM. En ciertas realizaciones, no se añade, ni está presente, guanidio o una sal o un análogo del mismo (por ejemplo, cloruro de guanidio, clorhidrato de guanidio y tiocianato de guanidio) a o en una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente guanidio o una sal o un análogo del mismo (por ejemplo, cloruro de guanidio, clorhidrato de guanidio y tiocianato de guanidio) en cualquier etapa en los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la concentración de urea o de un análogo de la misma (por ejemplo, dimetilhidroxi urea, dimetilsulfona)

en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento es menor de 1 M, de 100 mM, de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de 10^{-2} mM, de 10^{-3} mM, de 10^{-4} mM, de 10^{-5} mM o de 10^{-6} mM. En ciertas realizaciones, no se añade, ni está presente, urea o análogos de la misma (por ejemplo, dimetilhidroxi urea y dimetilsulfona), a o en una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente urea o análogos de la misma (por ejemplo, dimetilhidroxi urea y dimetilsulfona) en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la concentración de un detergente, por ejemplo, iónico o no iónico, en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento, es menor de 1 M, de 100 mM, de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de 10^{-2} mM, de 10^{-3} mM, de 10^{-4} mM, de 10^{-5} mM o de 10^{-6} mM, o menor de una concentración final del 10 %, del 1 %, del 0,1 %, del 0,01 % o del 0,001 %. En ciertas realizaciones, no se añade, ni hay presente un detergente, por ejemplo, iónico o no iónico, a o en una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente un detergente, por ejemplo, iónico o no iónico, en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento. Algunos detergentes no iónicos incluyen TRITON™ X-100, NONIDET™ P-40, la serie TWEEN™ y la serie BRIJ™. Algunos detergentes iónicos incluyen desoxicolato, SDS y CTAB.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento no usan una cantidad significativa de un agente reductor. Un agente reductor es un agente que rompe los puentes de disulfuro reduciendo una o las dos cisteínas del puente de disulfuro que mantiene las cisteínas en un estado reducido (es decir, mantiene los grupos sulfhidrilo libres de forma que los puentes de disulfuro intra- o intermoleculares son escindidos químicamente). Una "cantidad significativa" de un agente reductor es una cantidad que es suficiente para reducir al menos algunos de los puentes de disulfuro de una solución de proteínas, o para mantener al menos algunas cisteínas de una solución de proteínas en un estado o reducido. Algunos ejemplos de agentes reductores incluyen los siguientes: beta-mercaptoetanol (BME), ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutatión y borhidruro de sodio. En ciertas realizaciones, no se añade, ni hay presente, un agente reductor, a o en una o más de las siguientes soluciones usadas en los métodos descritos en el presente documento: la solución en suspensión, tal como una solución de CI en suspensión; el tampón de solubilización; y el tampón de replegado. En ciertas realizaciones, no se usa ni hay presente un agente reductor en cualquier etapa en los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la concentración de un agente reductor en cualquier etapa de los métodos descritos en el presente documento es menor de 10 mM, de 1 mM, de 0,1 mM, de 10^{-2} mM, de 10^{-3} mM, de 10^{-4} mM, de 10^{-5} mM o de 10^{-6} mM.

Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, de una proteína que está presente en los CI, puede incluir el lavado de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, de los CI, antes de suspenderlos en una solución en suspensión. El lavado de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, de los CI, puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un tampón de Tris/HCL, un tampón de fosfato, un tampón de acetato, un tampón de citrato o agua, o una combinación de dos o más de estos.

Suspensión de la proteína desnaturalizada

Una proteína desnaturalizada, por ejemplo, una proteína en CI, proteína desnaturalizada que puede estar, por ejemplo, en forma de un sedimento (tal como un sedimento congelado), puede estar suspendida en una solución en suspensión (o tampón). La proteína desnaturalizada puede ser incubada con la solución en suspensión en unas condiciones suficientes para suspender sustancialmente la proteína desnaturalizada. La incubación puede tener lugar en unas condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permitan la suspensión de la cantidad deseada o de la mayor parte o de sustancialmente toda la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

En ciertas realizaciones, la solución en suspensión es agua. El agua puede ser, por ejemplo, agua corriente, destilada, bidestilada, agua desionizada, agua con ósmosis inversa o agua con ósmosis inversa/desionizada (RODI). En ciertas realizaciones, una solución en suspensión comprende unas concentraciones bajas de un tampón, por ejemplo, de TRIS/HCL, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 mM, 1 mM, 0,1 mM o menos de TRIS. Una solución en suspensión puede tener un pH de 6-10, de 6-9, de 6-8, de entre 6,5 y 7,5.

En ciertas realizaciones, se pone en contacto un sedimento de la proteína desnaturalizada con una solución en suspensión en una proporción en peso del sedimento de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI) (en gramos):volumen (en ml) de la solución en suspensión (por ejemplo, la solución en suspensión de los CI) de 1:1-10; de 1:1-9; de 1:1-8; de 1:1-7; de 1:1-6; de 1:1-5; de 1:1-4; de 1:1-3; de 1:1-2; de 1:1; de 1:2; de 1:3; de 1:4; de 1;5; de 1:6; de 1:7; de 1:8 de 1:9 o de 1:10. En ciertas realizaciones, se pone en contacto un sedimento de la proteína desnaturalizada con una solución en suspensión en una proporción en peso del sedimento de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI) (en gramos):volumen (en ml) de la solución en suspensión (por ejemplo, la solución en suspensión de los CI) de 1:1-3. Una proporción entre peso y volumen de "1:3" en este contexto se refiere a una proporción de 1 gramo de proteína desnaturalizada por 3 ml de solución en suspensión. Una proporción entre peso y volumen de "1:1-3" en este contexto se refiere a una proporción de 1 gramo de proteína desnaturalizada por

1-3 ml (por ejemplo, 1 ml, 2 ml o 3 ml y cualquier valor intermedio) de la solución en suspensión. Una proporción entre peso y volumen también puede definirse en kgs:litros. La combinación de las proteínas desnaturalizadas y la solución en suspensión se denomina "reacción de suspensión".

La reacción de suspensión puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 ºC y 40 ºC; entre 4 ºC y 37 ºC; entre 25 ºC y 37 ºC; a la temperatura ambiente; o entre 4 ºC y 25 ºC. En un ejemplo de realización, un sedimento de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, se suspende en agua a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 25 ºC) a una proporción entre el peso (gramos) y el volumen (ml) del sedimento de la proteína desnaturalizada:solución en suspensión de 1:1-3, tal como de 1:1, de 1:2 o de 1:3.

Una reacción de suspensión puede ser incubada, y opcionalmente agitada, con una solución en suspensión hasta que la mayor parte o esencialmente toda la proteína desnaturalizada haya sido resuspendida, y opcionalmente se obtiene una suspensión fina. Cualquier porción de un sedimento de la proteína desnaturalizada que haya sido completamente suspendida probablemente no se renaturalizará de una forma eficaz. La proporción de la proteína desnaturalizada que se suspende en la solución en suspensión puede determinarse ópticamente. En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada se incuba, y opcionalmente se agita, por ejemplo, durante menos de 1 minuto, en la suspensión tampón. En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada se incuba, y opcionalmente se agita, por ejemplo, durante 1-10 minutos; 1-5 minutos o 1-3 minutos en la solución en suspensión. También pueden usarse unos tiempos de incubación más largos, especialmente a unas temperaturas menores.

En ciertas realizaciones, un sedimento de la proteína desnaturalizada se suspende en agua a una proporción entre peso (gramos) y volumen (ml) del sedimento de la proteína desnaturalizada:volumen de solución en suspensión de 1:1-3, por ejemplo, de 1:2, a la temperatura ambiente, y se incuba a la temperatura ambiente durante 1-3 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteínas desnaturalizadas. En un ejemplo de realización, un sedimento de los CI se suspende en agua en una proporción entre peso (gramos) y volumen (ml) de los CI:solución en suspensión de 1:1-3, por ejemplo, de 1:2, a la temperatura ambiente, y se incuba a la temperatura ambiente durante 1-3 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de los CI.

En ciertas realizaciones, la solución en suspensión o la reacción de suspensión no comprende una cantidad significativa de agente desnaturalizante, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, la solución en suspensión o la reacción de suspensión no comprende una cantidad significativa de agente reductor, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, la solución en suspensión o la reacción de suspensión no comprende ni una cantidad significativa de agente desnaturalizante ni una cantidad significativa de agente reductor.

Solubilización de la proteína desnaturalizada

Una suspensión de proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, una suspensión de los CI, (obtenida, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente) puede combinarse con un tampón de solubilización para obtener así una composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada, por ejemplo, los CI solubilizados. En ciertas realizaciones, una proteína desnaturalizada, por ejemplo, en forma de un sedimento, se combina directamente con un tampón de solubilización, sin ninguna suspensión previa. La proteína desnaturalizada, por ejemplo, en forma de una suspensión de proteínas desnaturalizadas, puede incubarse con un tampón de solubilización en unas condiciones suficientes para solubilizar sustancialmente la proteína. La incubación puede tener lugar en unas condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permita la solubilización de la cantidad deseada o de la mayor parte o de sustancialmente toda la proteína (por ejemplo, de al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

En ciertas realizaciones, un tampón de solubilización comprende un agente tamponante adecuado para mantener el pH del tampón de solubilización y/o el de la composición que comprende el tampón de solubilización y la proteína desnaturalizada ("reacción de solubilización") en un intervalo de pH de entre 10 y 13. El pH del tampón de solubilización y/o de la reacción de solubilización también puede estar en los siguientes intervalos de pH: un pH de entre 10,5 y 13; un pH de entre 11 y 13; un pH de entre 11 y 12,8; un pH de entre 11,5 y 12,8; un pH de entre 11,8 y 12,6; un pH de entre 12,0 y 12,6; un pH de entre 12,0 y 12,4 y un pH de entre 12,2 y 12,5. Algunos ejemplos de pH de los tampones de solubilización y/o de las reacciones de solubilización incluyen un pH de 12,0; un pH de 12,1; un pH de 12,2; un pH de 12,3; un pH de 12,4 y un pH de 12,5.

Un tampón de solubilización puede comprender arginina (u otro aminoácido cargado positivamente), por ejemplo, L-arginina/HCl (está englobado por el término "arginina"). Un tampón de solubilización puede comprender arginina a una concentración que sea suficiente para tamponar el tampón de solubilización al pH deseado, por ejemplo, a un pH en el intervalo de pH de entre 10,5 y 13; tal como un pH de 12,0 a pH 12,5. La arginina puede estar presente a unas concentraciones en el intervalo de entre 50 mM y 500 mM; de entre 100 mM y 500 mM; de entre 200 mM y 500 mM; de entre 300 mM y 500 mM; de entre 350 mM y 450 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización incluye arginina a una concentración de entre 300 mM y 400 mM. En ciertas realizaciones, un tampón de solubilización comprende arginina a entre 50 mM y 500 mM, y tiene un pH en el intervalo de entre 10,5 y 13. En ciertas realizaciones, un tampón de solubilización comprende arginina a entre 200 mM y 500 mM y tiene un pH en el intervalo de entre 12 y

12,4.

Como la arginina tampona el pH de una solución en un valor alcalino, no es necesario incluir otro tampón en el tampón de solubilización. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se pueden incluir uno o más de los siguientes tampones: TRIS (tris[hidroximetil] aminometano), HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[3-propansulfónico]), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propansulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico), CHES (ácido 2-[N-ciclohexilamino] etansulfónico), arginina, lisina y borato de sodio. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de entre 1 mM y 1 M; de entre 1 mM y 100 mM; de entre 10 mM y 100 nM; de entre 10 mM y 50 mM; de entre 50 mM y 100 mM; de entre 30 mM y 70 mM; o de entre 40 mM y 60 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS, por ejemplo, a 40-60 mM, y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 12,0 y 12,4.

El tampón de solubilización puede comprender TRIS y arginina y tiene un pH en el intervalo de entre 12,0 y 12,4. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina; y tiene un pH en el intervalo de entre pH 12,0 y 12,4. El tampón de solubilización puede comprender TRIS y arginina, en el que la arginina está a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de entre 12,0 y 12,4. El tampón de solubilización puede comprender TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de entre pH 12,0 y 12,4. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 12,0 y 12,4. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 50 mM, arginina a una concentración de aproximadamente 400 mM, y tiene un pH de aproximadamente 12,2.

La composición que comprende la proteína desnaturalizada suspendida, por ejemplo, los CI suspendidos, puede combinarse con un tampón de solubilización en una proporción entre peso (en gramos) y volumen (en ml) del peso de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI):volumen de tampón de solubilización de 1:5-50; de 1:10-50; de 1:10-30; de 1:15-25. Algunos ejemplos de proporciones incluyen 1:10, 1:20 y 1:30. Por ejemplo, para 1 gramo de proteína desnaturalizada (que se ha suspendido en la solución en suspensión), pueden añadirse 5-50 ml; 10-50 ml; entre 10 y 30 ml o entre 15 y 25 ml de tampón de solubilización. En otras realizaciones, para 1 kg de proteína desnaturalizada (que se ha suspendido en la solución en suspensión), pueden añadirse 5-50 litros; 10-50 litros; entre 10 y 30 litros o entre 15 y 25 litros de tampón de solubilización.

La reacción de solubilización puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 ºC y 40 ºC; entre 4 ºC y 37 ºC; entre 25 ºC y 37 ºC; a la temperatura ambiente; o entre 4 ºC y 25 ºC. En ciertas realizaciones, la reacción de solubilización se lleva a cabo a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 25 ºC) a una proporción entre el peso (en gramos) y el volumen (en ml) del peso de la proteína desnaturalizada (por ejemplo, de los CI):volumen de tampón de solubilización de 1:10-30, por ejemplo, de 1:10, de 1:20 o de 1:30.

La composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas y el tampón de solubilización (la "reacción de solubilización") se incuba, y opcionalmente, se agita, durante un tiempo suficiente para solubilizar esencialmente toda (por ejemplo, al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %) la proteína, por ejemplo, antes de la adición del tampón de replegado. La reacción de solubilización puede incubarse durante menos de 1 minuto; durante entre 1 minuto y 6 horas; durante entre 1 minuto y 5 horas; durante entre 1 minuto y 3 horas; durante entre 1 minuto y 2 horas; durante entre 1 y 60 minutos; durante entre 1 y 30 minutos; durante entre 1 y 20 minutos; durante entre 1 y 10 minutos; durante entre 1 y 5 minutos; durante entre 1 y 3 minutos; durante entre 1 y 2 minutos; durante entre 2 y 5 minutos o durante entre 2 y 3 minutos, por ejemplo, antes de la adición del tampón de replegado. La reacción de solubilización se lleva a cabo preferentemente durante un periodo de tiempo suficiente para que se solubilice la mayor parte de las proteínas. Esa mayor parte o esencialmente todas las proteínas que han sido solubilizadas en el tampón de solubilización pueden ser determinadas ópticamente, ya que la solución se vuelve clara (transparente) una vez que todas o la mayor parte de las proteínas se han solubilizado. Al mismo tiempo, es preferible mantener el tiempo de incubación de la reacción de solubilización lo más corto posible ya que se produce una desamidación a unos valores de pH elevados. Por ejemplo, la incubación de la reacción de solubilización puede llevarse a cabo durante un tiempo que dé como resultado una desamidación menor del 15 %; del 12 %; del 10 %; del 7 %; del 5 %; del 3 %; del 2 % o del 1 % (que se corresponde, por ejemplo, con el porcentaje total aditivo de la desamidación y la formación de isoaspartato en múltiples sitios). La desamidación puede medirse, por ejemplo, mediante una cromatografía de líquidos acoplada a una espectroscopia de masas (CLEM)/análisis del mapa peptídico.

En ciertas realizaciones se combina una suspensión de proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, de los CI, y opcionalmente se mezcla, con un tampón de solubilización que comprende arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM y opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; y que tiene un pH en el intervalo de entre 12,0 y 12,4 en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30, a la temperatura ambiente; y en la que la incubación se lleva a cabo durante entre 2 y 5 minutos, por ejemplo, antes de la adición del tampón de replegado, para obtener así una composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas, por ejemplo, los CI

solubilizados.

En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización o la reacción de solubilización no comprende una cantidad significativa de agente desnaturalizante, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización o la reacción de solubilización no comprende una cantidad significativa de agente reductor, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización o la reacción de solubilización no comprende ni una cantidad significativa de agente desnaturalizante ni una cantidad significativa de agente reductor.

La concentración de proteína durante la etapa de solubilización puede ser de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10-50 mg/ml.

Replegado de la proteína desnaturalizada

Una composición que comprende una proteína solubilizada desnaturalizada, por ejemplo, una composición que comprende los CI solubilizados, (obtenidos, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente) puede combinarse con un tampón de replegado, para obtener así una composición que comprende la proteína replegada. La composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas puede incubarse con un tampón de replegado en unas condiciones suficientes para replegar sustancialmente la proteína. La incubación puede tener lugar en unas condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación para permitir el replegado de la cantidad deseada o de la mayor parte o sustancialmente toda la proteína (por ejemplo, al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %).

En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende un agente tamponante adecuado para mantener el pH del tampón de replegado y/o el de la composición que comprende el tampón de replegado solubilizado y la proteína solubilizada (la "reacción de replegado") en un intervalo de pH de entre 9 y 11. El pH del tampón de replegado y/o de la reacción de replegado también puede estar en los siguientes intervalos de pH: un pH de entre 9 y 11; un pH de entre 9,5 y 11; un pH de entre 10 y 11; un pH de entre 10 y 10,5; un pH de entre 10 y 10,8; y un pH de entre 10,2 y 10,6. Algunos ejemplos de pH de los tampones de replegado y/o de las reacciones de replegado incluyen un pH de 10,0; un pH de 10,1; un pH de 10,2; un pH de 10,3; un pH de 10,4; un pH de 10,5; un pH de 10,6 y un pH de 10,7.

El tampón de replegado puede comprender arginina (u otro aminoácido cargado positivamente), por ejemplo, L-arginina/HCl (que está englobado por el término "arginina"). Un tampón de replegado puede comprender arginina a una concentración que es suficiente para tamponar el tampón de solubilización al pH deseado, por ejemplo, a un pH en el intervalo de entre pH 9 y 11; tal como un pH de entre 10 y 10,8. La arginina puede estar presente a unas concentraciones en el intervalo de entre 50 mM y 500 mM; de entre 100 mM y 500 mM; de entre 200 mM y 500 mM; de entre 300 mM y 500 mM; de entre 350 mM y 450 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado incluye arginina a una concentración de entre 300 mM y 400 mM. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende arginina a entre 50 mM y 500 mM y tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende arginina a entre 200 mM y 500 mM y tiene un pH en el intervalo de entre pH 10 y 10,8.

Como la arginina está tamponando la solución de replegado a un pH de 10,4, no es necesario incluir otro tampón. Sin embargo, si se desea, pueden añadirse cualquiera de los siguientes tampones: TRIS (tris[hidroximetil] aminometano), HEPPS (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[3-propansulfónico]), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propansulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico), CHES (ácido 2-[N-ciclohexilamino] etansulfónico), arginina, lisina y borato de sodio. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado incluye un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de entre 1 mM y 1 M; de entre 1 mM y 100 mM; de entre 10 mM y 100 nM; de entre 10 mM y 50 mM; de entre 50 mM y 100 mM; de entre 30 mM y 70 mM; o de entre 40 mM y 60 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende un tampón, por ejemplo, TRIS, a una concentración de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS, por ejemplo, a entre 40-60 mM, y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6.

El tampón de replegado puede comprender TRIS y arginina y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6. El tampón de replegado puede comprender TRIS y arginina, en el que la arginina está a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6. El tampón de replegado puede comprender TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado comprende TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM; arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; y tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6. En ciertas realizaciones, el tampón de solubilización comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 50 mM, arginina a una concentración de aproximadamente 400 mM, y tiene un pH de aproximadamente 10,4.
En algunas realizaciones, en las que la proteína que va a ser replegada comprende uno o más puentes de disulfuro cuando está plegada apropiadamente, el tampón de replegado también puede comprender un agente oxidante para

facilitar la formación de los puentes de disulfuro. Para el replegado de proteínas que no comprenden un puente de disulfuro, no es necesario incluir un agente oxidante. En ciertas realizaciones, el agente oxidante comprende glutatión, por ejemplo, en una proporción entre glutatión oxidado:glutatión reducido de aproximadamente 5:1 o una proporción similar suficiente para facilitar la formación de los puentes de disulfuro. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende entre 0,1 mM y 10 mM de glutatión oxidado y entre 0,02 mM y 2 mM de glutatión reducido. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende entre 0,5 mM y 2 mM de glutatión oxidado y entre 0,1 y 0,4 mM de glutatión reducido. En ciertas realizaciones, un tampón de replegado comprende aproximadamente 1 mM de glutatión oxidado y aproximadamente 0,2 mM de glutatión reducido. También pueden usarse otros agentes oxidantes conocidos en la materia.

Una composición que comprende la proteína solubilizada puede combinarse con un tampón de replegado en una proporción en volumen (ml) de tampón de solubilización usado para solubilizar la proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de replegado de 1:1-50; de 1:1-20; de 1:1-10; de 1:1-5; de 1:2-10; de 1:2-8; o de 1:2-5. Algunos ejemplos de proporciones incluyen aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4; 1:5 o 1:6.

La reacción de replegado puede llevarse a cabo a una temperatura que varía, por ejemplo, entre 2 ºC y 40 ºC; entre 4 ºC y 37 ºC; entre 25 ºC y 37 ºC; a la temperatura ambiente; o entre 4 ºC y 25 ºC. En ciertas realizaciones, la reacción de replegado se lleva a cabo a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 25 ºC) a una proporción entre el volumen (ml) de tampón de solubilización usado para solubilizar la proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de replegado de 1:1-5, por ejemplo, de 1:1, de 1:3 o de 1:5.

El replegado se produce esencialmente instantáneamente, generalmente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para que la mayoría de las proteínas puedan ser replegadas. En ciertas realizaciones, la reacción de replegado puede incubarse (por ejemplo, con o sin agitación), por ejemplo, durante una noche; durante entre 1 minuto y 12 horas; durante entre 1 minuto y 6 horas; durante entre 1 minuto y 3 horas; durante entre 1 y 120 minutos; durante entre 1 y 30 minutos; durante entre 1 y 20 minutos; durante entre 1 y 10 minutos; durante entre 1 y 100 minutos; durante entre 10 y 100 minutos; durante entre 10 y 80 minutos; durante entre 20 y 60 minutos antes, por ejemplo, de ajustar el pH hacia abajo. La incubación puede llevarse a cabo con o sin agitación. En ciertas realizaciones, la reacción de replegado se agita y después se incuba sin agitación.

En ciertas realizaciones, una composición que comprende las proteínas solubilizadas se combina con un tampón de replegado que comprende arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM; glutatión oxidado a una concentración en el intervalo de entre 0,5 mM y 2 mM; (opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM) glutatión reducido a una concentración en el intervalo de entre 0,1 y 0,4 mM, y que tiene un pH en el intervalo de entre 10,2 y 10,6, a una proporción en volumen del tampón de solubilización:tampón de replegado de 1:1-5, y se incuba a la temperatura ambiente durante entre 1 minuto y una noche, antes, por ejemplo, de ajustar el pH a un valor menor.

En ciertas realizaciones, el tampón de replegado o la reacción de replegado no comprende una cantidad significativa de agente desnaturalizante, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado o la reacción de replegado no comprende una cantidad significativa de agente reductor (excepto cuando se administra junto con un oxidante, por ejemplo, cuando se añaden conjuntamente glutatión oxidado y reducido), como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tampón de replegado o la reacción de replegado no comprende ni una cantidad significativa de un agente desnaturalizante ni una cantidad significativa de un agente reductor.

Después de la reacción de replegado, el pH puede ajustarse a un valor menor, por ejemplo, a un pH de entre 6 y 8 o a un pH de entre 7 y 8. En ciertas realizaciones, el pH se ajusta aproximadamente a un pH de 8. En ciertas realizaciones, el ajuste hacia abajo del pH hasta aproximadamente pH 8 comprende la adición de 0,3 veces el volumen de HCl 1 M. La adición del HCl puede llevarse a cabo lentamente, por ejemplo, a lo largo de entre 0,5 y 2 minutos.

Después del ajuste a un pH menor, la mezcla de reacción puede incubarse durante entre 30 minutos y 3 horas; durante entre 30 minutos y 2 horas, o durante una noche, antes de una siguiente etapa, por ejemplo, una etapa de purificación. La proteína replegada puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo, purificada, según los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando una cromatografía de la proteína A y otros tipos de cromatografía o de métodos de purificación.

La concentración de proteína durante la etapa de replegado puede ser de desde 1 mg/ml o menos hasta aproximadamente 10 mg/ml. Por ejemplo, la concentración de proteína puede ser de aproximadamente 5 mg/ml, de 6 mg/ml o de 7 mg/ml.

En ciertas realizaciones, la recuperación total de proteína replegada según se describe en el presente documento puede ser mayor del 70 % o del 80 % medida mediante una cromatografía en fase inversa. Las recuperaciones totales a la salida del procesado pueden ser tan altas como del 20 %, del 30 %, del 40 % o más a partir de la solubilización de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, de los CI, a través de una cromatografía final.

Durante la expresión y la purificación estándar de la proteína recombinante que comprende un Fc, el puente de disulfuro del bucle CH3 se rompe en aproximadamente un 0,5-5 % de la composición de la proteína. Usando ciertos métodos descritos en el presente documento, se ha demostrado que el bucle CH3 abierto está en el intervalo del 0,5-3 % en las proteínas replegadas. Consecuentemente, algunas composiciones de proteínas que contienen un Fc, en las que las proteínas han sido replegadas según se describe en el presente documento, tienen menos del 5 %, del 4 %, del 3 %, del 2 %, del 1 % de bucles CH3 abiertos. También se ha demostrado en el presente documento que la desamidación puede reducirse desde el 40 % hasta el 12 % (porcentaje aditivo total de desamidación y formación de isoasp en múltiples sitios). Consecuentemente, en ciertas realizaciones, la proteína replegada usando un método descrito en el presente documento comprende menos del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 15 % o del 13 % de desamidación.

En ciertas realizaciones, el replegado de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, se lleva a cabo en menos de 4 horas, de 3 horas o de 2 horas.

Ejemplos de métodos

Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, puede comprender: (i) suspender un sedimento de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en una solución en suspensión (por ejemplo, agua) a una proporción en peso (gramos) de sedimento de proteína desnaturalizada:volumen (ml) de solución en suspensión de 1:1-3 a la temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para que la mayor parte de la proteína desnaturalizada se suspenda, por ejemplo, 1-10 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar (y opcionalmente mezclar) la composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende arginina a una concentración suficiente para tamponar el tampón de solubilización a un pH en el intervalo de pH de entre 12,0 y 12,4, por ejemplo, en el intervalo de entre 100 mM y 500 mM (y opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM); en una proporción en peso (gramos) de proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30, en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para solubilizar la mayor parte de la proteína desnaturalizada, por ejemplo, entre 2 y 5 minutos, para obtener así una composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada; y (iii) combinar la composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada con un tampón de replegado que comprende arginina a una concentración suficiente para tamponar el tampón de replegado a un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6, por ejemplo, a una concentración en el intervalo de entre 100 mM y 500 mM (y opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 10 mM y 100 mM); una concentración de agente oxidante suficiente para favorecer la formación de puentes de disulfuro, por ejemplo, glutatión oxidado a una concentración en el intervalo de entre 0,5 mM y 2 mM, y glutatión reducido a una concentración en el intervalo de entre 0,1 mM y 0,4 mM; en una proporción en volumen del tampón de solubilización usado en la etapa (ii):volumen de tampón de replegado de 1:1-5, en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para replegar la mayor parte de la proteína, por ejemplo, durante entre 1 minuto y durante una noche; y en el que el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente desnaturalizante y opcionalmente no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (distinto al agente reducido que se usa junto con el agente oxidante).

En ciertas realizaciones, un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, por ejemplo, a partir de un CI, comprende: (i) suspender un sedimento de proteína desnaturalizada, por ejemplo, un sedimento de CI, en agua a una proporción de volumen en peso (gramos) de sedimento de proteína desnaturalizada:volumen (ml) de agua de 1:1-3 a la temperatura ambiente durante 1-10 minutos, para obtener así una composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada; (ii) combinar y mezclar la composición que comprende una suspensión de proteína desnaturalizada con un tampón de solubilización que comprende arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM (y opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM); y que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 12,0 y 12,4; en una proporción en peso (gramos) de la proteína desnaturalizada:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30, en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante entre 2 y 5 minutos, para obtener así una composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada; y (iii) combinar la composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada con un tampón de replegado que comprende arginina a una concentración en el intervalo de entre 300 mM y 500 mM (y opcionalmente TRIS a una concentración en el intervalo de entre 30 mM y 70 mM); glutatión oxidado a una concentración en el intervalo de entre 0,5 mM y 2 mM; glutatión reducido a una concentración en el intervalo de entre 0,1 mM y 0.4 mM; y que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10,2 y 10,6; en una proporción en volumen del tampón de solubilización usado en la etapa (ii):volumen de tampón de replegado de 1:1-5, en el que la incubación se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante de entre 1 y 120 minutos; y en el que el método no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente desnaturalizante y opcionalmente no comprende el uso de una cantidad significativa de un agente reductor (distinto al agente reducido que se usa junto con el agente oxidante).

Generalmente, el margen de error del pH para una solución tampón preparada es de +/- 0,1 unidades.

Ejemplos de proteínas

Las proteínas que pueden ser replegadas a partir de un estado desnaturalizado, por ejemplo, a partir de un CI, usando

los métodos descritos en el presente documento, incluyen cualquier proteína que esté en una forma desnaturalizada, por ejemplo, las proteínas que comprenden al menos un puente de disulfuro en su estado nativo. Las proteínas sin puentes de disulfuro también pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Las proteínas pueden comprender un dominio de unión que se une específicamente a una proteína objetivo. Una proteína puede ser una proteína natural o una modificada genéticamente, o una proteína de fusión. Un ejemplo de proteína que puede ser replegada según se describe en el presente documento es una proteína que contiene una proteína Fc, tal como una Fc fusionada con un dominio heterólogo (por ejemplo, un dominio no Fc o no anticuerpo). Una proteína heteróloga puede ser cualquier proteína, incluyendo una porción de unión al antígeno de un anticuerpo, y los derivados de la misma, por ejemplo, Fab, scFv, scFv biespecíficos, anticuerpos de dominio único ("sdAb") (por ejemplo, V_hH o anticuerpos de camélido y V_{NAR}), diacuerpos (dAb), diacuerpos de cadena única (scDb), Darpin, anticalinas y soportes basados en fibronectina, tales como ^{10}Fn3, Fibcon y Tencon. Un anticuerpo completo también puede ser replegado según se describe en el presente documento. Las proteínas heterólogas unidas a un Fc también pueden no estar relacionadas con anticuerpos, y pueden ser, por ejemplo, TsNFR.

Soportes basados en fibronectina

Según se usa en el presente documento, una proteína o una fracción de "soporte basado en fibronectina" o "FBS" se refiere a proteínas o a fracciones que están basadas en una repetición de tipo fibronectina III ("Fn3"). La Fn3 es un pequeño dominio (de aproximadamente 10 kDa) que tiene la estructura de un pliegue de inmunoglobulina (Ig) (es decir, una estructura en sándwich β de tipo Ig, que consiste en siete hebras β y seis bucles). La fibronectina tiene 18 repeticiones Fn3, y aunque la homología en la secuencia entre las repeticiones es baja, todas ellas comparten una elevada similitud en la estructura terciaria. Los dominios Fn3 también están presentes en muchas proteínas distintas a la fibronectina, tales como moléculas de adhesión, moléculas de la superficie celular, por ejemplo, receptores de citocinas y dominios de unión a carbohidratos. Para revisiones, véase Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89 (19): 8990-4 (1992); Bork et al., J Mol Biol. 242 (4): 309-20 (1994); Campbell & Spitzfaden, Structure 2 (5): 333-7 (1994); Harpez & Chotia, J Mol Biol. 238 (4): 528-39 (1994)). El término proteína o fracción de "soporte basado en fibronectina" pretende incluir los soportes basados en dominios Fn3 a partir de estas otras proteínas (es decir, de moléculas que no son fibronectina).

Un ejemplo de proteínas de soporte basadas en fibronectina son las Adnectinas (Adnexus, un subsidiario de propiedad completa de Bristol-Myers Squibb). Se ha demostrado que las regiones de bucle de tipo CDR de los soportes basados en fibronectina pueden ser modificados para evolucionar en una proteína capaz de unirse a cualquier compuesto de interés. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 7.115.396 describe proteínas del dominio Fn3 en las que las alteraciones en los bucles BC, DE y FG dan como resultado aglutinantes con una elevada afinidad por el TNFα. La Patente de EE.UU. nº 7.858.739 describe proteínas del dominio Fn3 en las que las alteraciones en los bucles BC, DE y FG dan como resultado aglutinantes con una elevada afinidad por el VEGFR2.

Un dominio Fn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de puentes de disulfuro, y por lo tanto es estable en condiciones reductoras. Los dominios Fn3 comprenden, con objeto de formar desde el N-terminal hacia el C-terminal, una hebra beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una hebra beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una hebra beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una hebra beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una hebra beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una hebra beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una hebra beta o de tipo beta, G. Las siete hebras β antiparalelas están dispuestas en forma de dos láminas beta que forman un núcleo estable, creando "caras" formadas por los bucles que conectan las hebras beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF están ubicados en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG están ubicados en la cara opuesta ("el polo norte"). Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión al ligando.

En algunos ejemplos de realizaciones, las fracciones de soporte basadas en fibronectina de unión al ligando descritas en el presente documento se basan en el décimo dominio de fibronectina de tipo III, es decir, el décimo módulo del Fn3 (^{10}Fn3). La secuencia de aminoácidos del ^{10}Fn3 humano natural (con la cola N-terminal (en cursiva)) se establece en la SEQ ID NO: 1:

*VSDVPRD*LEVVAA<u>TPTS</u>LLISW**DAPAVTVRY**YRITY<u>GETGGNSPVQE</u>FTV**PGSKS**

TATISGL<u>KPGVD</u>YTITVYA**VTGRGDSPASSKP**ISINY*RTEIDKPSQ* (SEQ ID NO: 1)

(los bucles AB, CD y EF están subrayados; los bucles BC, FG y DE están destacados en negrita; las hebras β están ubicadas entre cada una de las regiones de bucle; y las regiones N-terminal y C-terminal se muestran en cursiva). El ^{10}Fn3 natural sin la cola establecido en cursiva en la SEQ ID NO: 1 se proporciona como la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, el bucle AB se corresponde con los residuos 14-17, el bucle BC se corresponde con los residuos 23-31, el bucle CD se corresponde con los residuos 37-47, el bucle DE se corresponde con los residuos 51-56, el bucle EF se corresponde con los residuos 63-67, y el bucle FG se corresponde con los residuos 75-87 de la SEQ ID NO: 1. Los bucles BC, DE y FG se alinean a lo largo de una cara de la molécula, es decir, el "polo norte", y los bucles AB, CD y EF se alinean a lo largo de la cara opuesta de la molécula, es decir, el "polo sur". En la SEQ ID

NO: 1, la hebra β A se corresponde con los residuos 8-13, la hebra β B se corresponde con los residuos 18-22, la hebra β C se corresponde con los residuos 32-36, la hebra beta D se corresponde con los residuos 48-50, la hebra β E se corresponde con los residuos 57-62, la hebra β F se corresponde con los residuos 68-74, y la hebra β G se corresponde con los residuos 88-92. Las hebras β están conectadas entre sí a través del correspondiente bucle, por ejemplo, las hebras A y B están conectadas a través de un bucle AB en la formación de la hebra β A, el bucle AB, la hebra β B, etc. Las regiones N-terminal y/o C-terminal de la SEQ ID NO: 1 (en cursiva más arriba), pueden estar eliminadas o alteradas para generar una molécula que conserva la actividad biológica y que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-16. En ciertas realizaciones, los primeros 8 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o los últimos 7 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (es decir, los residuos de aminoácidos 1-8 y 95-101 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente) puede estar eliminados o alterados para generar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Según se ha descrito más arriba, los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos 14-17, 23-31, 37-47, 51-56, 63-67 y 75-87 de la SEQ ID NO: 1 definen los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente. Sin embargo, debería entenderse que no se necesita modificar todos los residuos de una región de bucle con objeto de conseguir un dominio de unión ^{10}Fn3 que tenga una fuerte afinidad por un objetivo deseado. Adicionalmente, también pueden realizarse inserciones y deleciones en las regiones de bucle produciendo todavía unos dominios de unión ^{10}Fn3 de elevada afinidad.

Consecuentemente, en algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados entre AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden ser extendidos o acortados en su longitud con respecto al correspondiente bucle en el ^{10}Fn3 humano natural. En cualquier polipéptido dado, uno o más bucles pueden ser extendidos en su longitud, uno o más bucles pueden ser reducidos a su longitud, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado puede ser extendida en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20 o 10-15 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado puede ser reducida en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 o 2-5 aminoácidos. En particular, el bucle FG del ^{10}Fn3 tiene 13 residuos de longitud, mientras que el correspondiente bucle en las cadenas pesadas del anticuerpo varía entre 4-28 residuos. Para optimizar la unión al antígeno en los polipéptidos que se basan en el FG para la unión al objetivo, por lo tanto, puede alterarse la longitud del bucle FG del ^{10}Fn3, así como su secuencia, para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posibles en la unión al objetivo.

En algunas realizaciones, uno o más residuos del motivo de unión a la integrina "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD) (los aminoácidos 78-80 de la SEQ ID NO: 1) pueden ser sustituidos de forma que se altere la unión a la integrina. En algunas realizaciones, el bucle FG de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no contiene un sitio de unión a la integrina RGD. En una realización, la secuencia RGD es sustituida por una secuencia de aminoácidos aminoácido polar-aminoácido neutro-aminoácido ácido (en la dirección desde N-terminal hacia C-terminal). En otra realización, la secuencia RGD es sustituida por SGE. En otra realización más, la secuencia RGD es sustituida por RGE (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 16).

Según se usa en el presente documento, un "dominio ^{10}Fn3" o "fracción ^{10}Fn3" se refiere al ^{10}Fn3 natural (por ejemplo, que comprende una de las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16) y las variantes biológicamente activas de las mismas, por ejemplo, las variantes biológicamente activas que se unen específicamente a un objetivo, tal como una proteína objetivo, y las variantes biológicamente activas que tienen la SEQ ID NO: 9, 11, 13 o 15. Un dominio ^{10}Fn3 natural puede comprender una de las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 y 16. Algunas variantes biológicamente activas de un dominio ^{10}Fn3 incluyen los dominios ^{10}Fn3 que comprenden al menos, como mucho o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio ^{10}Fn3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Una variante biológicamente activa de un dominio ^{10}Fn3 también puede comprender, o comprende como mucho, 1-3, 1-5, 1-10, 1-15, 1-10 o 1-25 cambios de aminoácidos con respecto a un dominio ^{10}Fn3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, una variante biológicamente activa de un dominio ^{10}Fn3 no comprende más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 1,2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio^{10}Fn3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Los cambios en los aminoácidos pueden estar en una región de bucle y/o en una hebra. Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos de ^{10}Fn3 degeneradas se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NO: 17-29.

En algunas realizaciones, una fracción de soporte basada en fibronectina comprende un dominio ^{10}Fn3 que tiene al menos una identidad del 40 %, del 50 %, del 55 %, del 60 %, del 65 %, del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 85 % o del 90 % con un dominio ^{10}Fn3 humano que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, la fracción de soporte basada en fibronectina proporcionada en el presente documento tiene una identidad de al menos el 50 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En otras realizaciones, la fracción de soporte basada en fibronectina tiene una identidad de al menos el 65 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprende las SEQ ID NO: 1-16. En ciertas realizaciones, uno o más de los bucles no se modificarán con respecto a la secuencia del correspondiente bucle de la secuencia natural, y/o una o más de las hebras β no se modificarán con respecto a la

secuencia de la correspondiente hebra β de la secuencia natural. En ciertas realizaciones, cada una de las hebras beta o de tipo beta de un dominio ^{10}Fn3 de una fracción de soporte basada en fibronectina puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % a la secuencia de la correspondiente hebra beta o de tipo beta de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, las variaciones en las regiones de hebras β no alterarán la estabilidad el polipéptido en condiciones fisiológicas. En algunos ejemplos de realizaciones, el dominio ^{10}Fn3 se une a un objetivo deseado con una K_d de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos. En algunas realizaciones, el dominio ^{10}Fn3 de un soporte de proteína basada en fibronectina se une a un objetivo deseado con una K_d de entre 1 pM y 1 μM, de entre 100 pM y 500 nM, de entre 1 nM y 500 nM o de entre 1 nM y 100 nM. En algunos ejemplos de realizaciones, la fracción de soporte basada en fibronectina se une específicamente a un objetivo que no es unido por un dominio ^{10}Fn3 natural, particularmente el dominio ^{10}Fn3 natural humano que tiene, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión comprenden una fracción de soporte basada en fibronectina que comprende un dominio ^{10}Fn3, en la que el dominio ^{10}Fn3 comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle, EF; y un bucle, FG; y tiene al menos un bucle seleccionado entre el bucle AB, BC, CD, DE, EF y FG con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del correspondiente bucle del dominio ^{10}Fn3 humano de la SEQ ID NO: 1-16. En algunas realizaciones, están alterados los bucles BC, DE y FG. En ciertas realizaciones, están alterados los bucles AB, CD y EF. En ciertas realizaciones, el bucle FG es el único bucle que está alterado. En otras realizaciones, están alterados ambos bucles CD y FG, y opcionalmente no hay ningún otro bucle alterado. En ciertas realizaciones, están alterados ambos bucles CD y EF, y opcionalmente no hay ningún otro bucle alterado. En algunas realizaciones, una o más alteraciones específicas del soporte se combinan con una o más alteraciones de bucles. Por "alterado" se entiende una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de molde (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humano natural) e incluye adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la fracción de soporte basada en fibronectina comprende un dominio ^{10}Fn3 en la que las regiones que no son un bucle comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80, el 85, el 90, el 95, el 98 o el 100 % a las regiones que no son un bucle de la SEQ ID NO: 1, en la que está alterado al menos un bucle seleccionado entre AB, BC, CD, DE, EF y FG. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el bucle AB puede tener hasta 4 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas; el bucle BC puede tener hasta 10 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas; el bucle CD puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas; el bucle DE puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos, hasta 13 inserciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas; el bucle EF puede tener hasta 5 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas; y/o el bucle FG puede tener hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 deleciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos, o una combinación de las mismas.

En ciertas realizaciones, una fracción de soporte basada en fibronectina comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias que consiste en las SEQ ID NO: 1-16, y la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo, por ejemplo, con una K_d de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 de nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos. Las proteínas pueden comprender cambios (o alteraciones) de aminoácidos en uno o más bucles y en una o más hebras.

En ciertas realizaciones, la fracción de soporte basada en fibronectina comprende un dominio ^{10}Fn3 que está definido generalmente por la siguiente secuencia:

$$\text{VSDVPRD}\underline{\textbf{LEVVAA}}(X)_u\underline{\textbf{LLISW}}(X)_v\underline{\textbf{YRITY}}(X)_w\underline{\textbf{FTV}}(X)_x\underline{\textbf{ATISGL}}(X)_y\underline{\textbf{YTITV}}$$

$$\underline{\textbf{YA}}(X)_z\underline{\textbf{ISINY}}\text{RT (SEQ ID NO: 17)},$$

o por la secuencia que tiene las SEQ ID NO: 18-29. En las SEQ ID NO: 17-29, el bucle AB está representado por $(X)_u$, el bucle BC está representado por $(X)_v$, el bucle CD está representado por $(X)_w$, el bucle DE está representado por $(X)_x$, el bucle EF está representado por $(X)_y$ y el bucle FG está representado por X_z. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice después de la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y y z pueden ser cada uno independientemente cualquiera de entre 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 o 6-7 aminoácidos. Las secuencias de las hebras beta (subrayadas) pueden tener cualquiera de entre 0 y 10, de entre 0 y 8, de entre 0 y 6, de entre 0 y 5, de entre 0 y 4, de entre 0 y 3, de entre 0 y 2 o de entre 0 y 1 sustituciones, deleciones o adiciones a lo largo de todas las 7 regiones de soporte con respecto a los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 17-29. En algunas realizaciones, las secuencias de las hebras beta pueden tener cualquiera de entre 0 y 10, de entre 0 y 8, de entre 0 y 6, de entre 0 y 5, de entre 0 y 4, de entre 0 y 3, de entre 0 y 2 o de entre 0 y 1 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas, a lo largo de todas las 7 regiones de soporte con respecto a los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 17-29. En

ciertas realizaciones, los residuos de aminoácidos del núcleo hidrófobo (los residuos en negrita de la anterior SEQ ID NO: 17) son fijos, y cualquier sustitución, sustitución conservativa, deleción o adición se produce en los residuos distintos a los residuos de aminoácidos del núcleo hidrófobo. En algunas realizaciones, los residuos del núcleo hidrófobo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no han sido modificados con respecto al dominio ^{10}Fn3 humano natural (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o 5).

En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de una fracción de soporte basada en fibronectina pueden estar modificadas mediante una deleción, una sustitución o una inserción con respecto a las secuencias de aminoácidos de las correspondientes regiones de los dominios ^{10}Fn3 que comprenden una de las SEQ ID NO: 1-16). En algunas realizaciones, los primero ocho (es decir, los residuos 1-8) y los últimos siete aminoácidos (es decir, los residuos 95-101) de la SEQ ID NO: 1 están delecionados, generando un dominio ^{10}Fn3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. También pueden añadirse secuencias adicionales en el N- o el C-terminal de un dominio ^{10}Fn3 que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-16. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la extensión N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: M, MG y G.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de la SEQ ID NO: 1 puede estar modificada o delecionada en los polipéptidos proporcionados en el presente documento con respecto a la secuencia de los correspondientes aminoácidos del dominio ^{10}Fn3 humano natural que tiene la SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos de realizaciones, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-8 de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por una región N-terminal alternativa que tiene 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Algunos ejemplos de regiones N-terminales alternativas incluyen (representadas por el código de aminoácidos de letra única) M, MG, G, MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 30) y GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 31), o truncamientos N-terminales, y una cualquiera de las SEQ ID NO: 30 y 31. Otras regiones N-terminales alternativas adecuadas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 32), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 33), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 34), X_nPRDL (SEQ ID NO: 35), X_nRDL (SEQ ID NO: 36), X_nDL (SEQ ID NO: 37) o X_nL, en las que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en las que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al N-terminal de un dominio ^{10}Fn3, el M habitualmente será escindido, dejando un G en el N-terminal. En otras realizaciones, la región N-terminal alternativa comprende la secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO: 38).

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 93-101, 94-101, 95-101, 96-101, 97-101, 98-101, 99-101, 100-101 o 101 de la SEQ ID NO: 1 está delecionada o modificada en los polipéptidos proporcionados en el presente documento con respecto a la secuencia de los correspondientes aminoácidos del dominio ^{10}Fn3 humano natural (SEQ ID NO: 1). En algunos ejemplos de realizaciones, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 95-101 de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por una región C-terminal alternativa que tiene 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Algunos ejemplos específicos de secuencias de regiones C-terminales alternativas incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, EIEK (SEQ ID NO: 39), EGSGC (SEQ ID NO: 40), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 41), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 42), EIEKP (SEQ ID NO: 43), EIEKPS (SEQ ID NO: 44), EIEKPC (SEQ ID NO: 45) o HHHHHH (SEQ ID NO: 46). En algunas realizaciones, la región C-terminal alternativa comprende EIDK (SEQ ID NO: 47), y en algunas realizaciones en particular, la región C-terminal alternativa es EIDKPCQ (SEQ ID NO: 48) o EIDKPSQ (SEQ ID NO: 49).

En ciertas realizaciones, una fracción de soporte basada en fibronectina comprende un dominio ^{10}Fn3 que tiene tanto una secuencia de una región N-terminal alternativa como una secuencia de una región C-terminal alternativa.

En ciertas realizaciones, una fracción de soporte basada en fibronectina se basa en una repetición Fn3 distinta a la 10ª repetición del dominio de tipo III de la fibronectina, por ejemplo, de la fibronectina humana. Por ejemplo, una fracción de soporte basada en fibronectina puede ser similar a cualquiera de las otras repeticiones de la fibronectina de tipo III, por ejemplo, la 1ª, la 2ª, la 3ª, la 4ª, la 5ª, la 6ª, la 7ª, la 8ª, la 9ª, la 11ª, la 12ª, la 13ª, la 14ª, la 15ª, la 16ª, la 17ª y la 18ª Fn3 repetición. En otras realizaciones más, una fracción de soporte basada en fibronectina puede proceder de una molécula distinta a la fibronectina. Algunos ejemplos de fracciones de soporte basadas en fibronectina pueden derivar de la tenascina, una proteína que está formada por 15 dominios Fn3 con unas similitudes en las secuencias similares entre sí como las que se encuentran en la fibronectina. Estas repeticiones se describen, por ejemplo, en Jacobs et al. (2012) Protein Engineering, Design & Selection 25: 107. Tomando como base la homología en las repeticiones de la molécula de fibronectina y la de la molécula de tenascina, se han creado moléculas artificiales basadas en estas homologías. Las secuencias de aminoácidos consenso basadas en la homología de los dominios con la molécula de fibronectina se denominan Fibcon y FibconB (documento WO2010/093627 y Jacobs et al. (2012) *supra*), y las basadas en la homología de los dominios de la molécula de tenascina se denominan Tencon. Un ejemplo de secuencia de aminoácidos Fibcon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGSDGRVKEFTVPPSVSSATITGLKPGTEYTISVIALKDNQESE PLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 50), en la que el bucle AB consiste en los aminoácidos 13-16 (TPSS; SEQ ID NO: 51), el bucle BC consiste en los aminoácidos 22-28 (TPPRVQI; SEQ ID NO: 52), el bucle CD consiste en los aminoácidos 38-43 (VGSDGR; SEQ ID NO: 53), el bucle DE consiste en los aminoácidos 51-54 (PSVS; SEQ ID NO: 54), el bucle EF consiste en los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 55) y el bucle FG consiste en los aminoácidos

75-81 (KDNQESEP; SEQ ID NO: 56). Otra secuencia de aminoácidos Fibcon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPSSTSVTI
TGITPGVEYVVSVYALKDNQESPPLVGTCTT (SEQ ID NO: 57; Jacobs et al., *supra*).

Las proteínas Fn3 derivadas de la tenascina incluyen Tencons (documento WO2010/051274, documento WO2010/051310 y documento WO2011/137319). Un ejemplo de proteína Tencon tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGH
RSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 58; Jacobs et al., *supra,* y documento WO2011/137319), en la que el bucle AB consiste en los aminoácidos 13-16 (TEDS; SEQ ID NO: 59, el bucle BC consiste en los aminoácidos 22-28 (TAPDAAF; SEQ ID NO: 60), el bucle CD consiste en los aminoácidos 38-43 (SEKVGE; SEQ ID NO: 61), el bucle DE consiste en los aminoácidos 51-54 (GSER; SEQ ID NO: 62), el bucle EF consiste en los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 63) y el bucle FG consiste en los aminoácidos 75-81 (KGGHRSN; SEQ ID NO: 64).

Una fracción Fibcon, FibconB o Tencon, o las variantes de unión al objetivo de las mismas, tanto por sí mismas como unidas a una fracción heteróloga, por ejemplo, a un Fc, pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Los dominios Fn3 de otras proteínas, por ejemplo, de receptores de hormonas y de citocinas de la superficie celular, de chaperoninas y de dominios de unión a carbohidratos, también pueden ser replegados según se describe en el presente documento, por sí mismos o como por parte de una proteína de fusión con, por ejemplo, un Fc.

Las proteínas o fracciones de soporte basadas en fibronectina se describen, por ejemplo, en el documento WO2010/093627, en el documento WO2011/130324, en el documento WO2009/083804, en el documento WO2009/133208, en el documento WO02/04523, en el documento WO2012/016245, en el documento WO2009/023184, en el documento WO2010/051310, en el documento WO2011/020033, en el documento WO2011/051333, en el documento WO2011/051466, en el documento WO2011/092233, en el documento WO2011/100700, en el documento WO2011/130324, en el documento WO2011/130328, en el documento WO2011/137319, en el documento WO2010/051274, en el documento WO2009/086116, en el documento WO09/058379 y en el documento WO2013/067029: cualquiera de las proteínas o de las fracciones de soporte basadas en fibronectina descritas en estas publicaciones puede ser replegada según se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, una proteína que puede ser replegada según se describe en el presente documento es una proteína multivalente que comprende dos o más fracciones de soporte basadas en fibronectina, por ejemplo, dominios ^{10}Fn3. Por ejemplo, una proteína de fusión multivalente puede comprender 2, 3 o más fracciones de soporte basadas en fibronectina, por ejemplo, dominios ^{10}Fn3, que están asociados covalentemente. En algunos ejemplos de realizaciones, la proteína de fusión es una proteína biespecífica o dimérica que comprende dos dominios ^{10}Fn3.

Dominios Fc

Las proteínas que pueden ser replegadas según se describe en el presente documento incluyen proteínas de fusión que comprenden una porción Fc fusionada con una heteróloga. En algunos aspectos, la porción heteróloga es un soporte basado en fibronectina, por ejemplo, un dominio ^{10}Fn3, sin embargo, la porción heteróloga puede ser cualquier otra proteína.

Según se usa en el presente documento, una "porción Fc" engloba los dominios derivados de una región constante de una inmunoglobulina, preferentemente de una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. Algunas inmunoglobulinas adecuadas incluyen la IgG1, la IgG2, la IgG3, la IgG4, y otras clases tales como la IgA, la IgD, la IgE y la IgM. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo de la región C-terminal de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, por separado o combinados. El término "fracción Fc" o "dominio Fc", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de las combinaciones de dominios CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4. Por lo tanto, un "dominio Fc" o una fracción puede comprender o no una bisagra.

A continuación se muestra la secuencia de una región constante de una inmunoglobulina IgG1 humana, y la posición relativa de cada dominio en la región constante está indicada basándose en el formato de numeración EU:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
*AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC*DKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65). La secuencia bisagra del núcleo está subrayada, y la región CH1 está en cursiva; las regiones CH2 y CH3 están en texto normal. Debería entenderse que la lisina C-terminal es opcional. En ciertas realizaciones, la lisina C-terminal de una secuencia de una IgG puede estar eliminada o sustituida por un aminoácido que no es lisina, tal como alanina, para aumentar

adicionalmente la semivida sérica de la proteína de fusión Fc.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende un dominio de bisagra, CH2 y CH3 humano, y puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66), en la que la secuencia bisagra del núcleo está subrayada, y las regiones CH2 y CH3 están en texto normal.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende una región CH2 y una CH3 de una IgG1 humana según se muestra a continuación:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD-WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67). Debería entenderse que la glicina y la lisina en el extremo de un dominio CH3 son opcionales.

Las proteínas de fusión Fc también pueden comprender un dominio Fc que es idéntico en al menos el 50 %, el 60 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-67. Una proteína de fusión Fc también puede comprender un dominio Fc que tiene al menos 50, 100 o 150 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 65-67. Las proteínas de fusión Fc también pueden comprender un dominio Fc que tiene 50-100, 50-150 o 100-150 aminoácidos contiguos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 65-67. Las proteínas de fusión Fc pueden comprender un dominio Fc que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 65-67 con 1-5, 1-10, 1-15, 1-20 o 1-25 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas.

El dominio Fc puede ser una secuencia Fc natural, incluyendo variantes naturales alélicas o de ayuste. Alternativamente, un dominio Fc puede ser un dominio Fc no natural, por ejemplo, un dominio híbrido que comprende una porción de un dominio Fc procedente de dos o más isotipos de Ig diferentes, por ejemplo, un dominio Fc híbrido de IgG2/IgG4. En algunos ejemplos de realizaciones, el dominio Fc procede de una molécula de inmunoglobulina humana. Alternativamente, el dominio Fc puede ser una versión humanizada o desinmunizada de un dominio Fc de un animal no humano, que incluye, pero no se limita a, un ratón, una rata, un conejo, un camello, una llama, un dromedario y un mono.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc es una variante de la secuencia de un Fc, por ejemplo, una secuencia Fc que ha sido modificada (por ejemplo, mediante una sustitución, una deleción y/o una inserción de aminoácidos) con respecto a una secuencia de un Fc parental (por ejemplo, un polipéptido Fc no modificado que es modificado posteriormente para generar una variante), para proporcionar unas características estructurales y/o una actividad biológica deseables.

Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones en la región Fc con objeto de generar una variante de una Fc que (a) tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentada o disminuida, (b) una citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) aumentada o disminuida, (c) una afinidad aumentada o disminuida por C1q y/o (d) tiene una afinidad aumentada o disminuida por un receptor Fc con respecto al Fc parental. Dichas variantes de la región Fc comprenderán al menos una modificación en un aminoácido en la región Fc. Se cree que la combinación de modificaciones de aminoácidos es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones específicas de la región Fc identificadas en el presente documento. Las proteínas que comprenden la Fc, que están mutadas para modificar la actividad biológica de la Fc, pueden ser replegadas según se describe en el presente documento. Algunos ejemplos de Fc mutantes se describen, por ejemplo, en el documento WO97/34631; en el documento WO96/32478; en la Patente de EE.UU. nº 5.624.821; en la Patente de EE.UU. nº 5.648.260; en la Patente de EE.UU. nº 6.194.551; en el documento WO 94/29351; en el documento WO 00/42072; en la Patente de EE.UU. nº 5.624.821; en la Patente de EE.UU. nº 6.277.375; en la Patente de EE.UU. nº 6.737.056; en la Patente de EE.UU. nº 6.194.551; en la Patente de EE.UU. nº 7.317.091; en la Patente de EE.UU. nº 8.101.720; en las Publicaciones de Patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217; WO 05/092925; WO 06/020114; y en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691; en la Patente de EE.UU. nº 6.277.375; en Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216; en Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356; en Dall Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169: 5171 -5180, en Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524; en Yeung et al., 2010, J Immunol, 182: 7663-7671; en el documento WO88/07054; en el documento WO88/07089; en la Patente de EE.UU. nº 6.277.375; en el documento WO99/051642; en el documento WO01/058957; en el documento WO2003/074679; en el documento WO2004/029207; en la Patente de EE.UU. nº 7.317.091 y en el documento WO2004/099249.

Algunos ejemplos de variantes de la Fc se establecen en las SEQ ID NO: 68-86. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que tiene al menos 50, 100 o 150

aminoácidos contiguos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 68-86. En otras realizaciones, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que tiene 50-100, 50-150 o 100-150 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 68-86. En otras realizaciones más, una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento comprende un dominio Fc que comprende las SEQ ID NO: 68-86 con 1-5, 1-10, 1-15, 1-20 o 1-25 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas.

Las proteínas de fusión Fc pueden contener una región de bisagra de una inmunoglobulina. La región de bisagra puede proceder de anticuerpos pertenecientes a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En ciertas realizaciones, la región de bisagra procede de cualquiera de las subclases de anticuerpos de la IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, la región de bisagra puede incluir adicionalmente residuos procedentes de las regiones CH1 y CH2 que flanquean la secuencia bisagra del núcleo, como se analiza adicionalmente a continuación.

En ciertas realizaciones, una bisagra contiene un residuo de cisteína libre que es capaz de formar un puente de disulfuro con otro monómero para formar un dímero. La secuencia de bisagra puede contener de forma natural un residuo de cisteína, o puede estar modificada para que contenga uno o más residuos de cisteína.

En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión Fc comprenden una región de bisagra procedente de una IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región de bisagra comprende los residuos de bisagra del núcleo DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 87) de la IgG1, que se corresponden con las posiciones 221-236 según la numeración EU.

En ciertas realizaciones, la secuencia de bisagra puede incluir sustituciones que confieren unas propiedades farmacocinéticas, biofísicas y/o biológicas deseables. Algunos ejemplos de secuencias de bisagra incluyen EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 88; región bisagra del núcleo subrayada), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 89; región bisagra del núcleo subrayada), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 90; región bisagra del núcleo subrayada), DKTHTCPPCPA-PELLGGPS (SEQ ID NO: 91; región bisagra del núcleo subrayada) y DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 92, región bisagra del núcleo subrayada). En una realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende una sustitución P122S (numeración EU 238) (por ejemplo, el residuo de prolina de la posición 122 en la SEQ ID NO: 22 está sustituido por serina). La sustitución P122S anula la función efectora del Fc y está ejemplificado por las bisagras que tienen una cualquiera de las SEQ ID NO: 25, 26 y 28. En otra realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende las sustituciones D104G y K105S (numeración EU 221-222). Las sustituciones D104G y K105S eliminan un potencial sitio de escisión, y por lo tanto aumentan la asistencia a la proteasa de la molécula de fusión. Una bisagra que tiene las sustituciones D104G y K105S está ejemplificada en la SEQ ID NO: 26. En otra realización, la secuencia de bisagra es un derivado de una bisagra de la IgG1 que comprende una sustitución C103S (numeración EU 220). La sustitución C103S impide la inadecuada formación de un puente de cisteína en ausencia de una cadena ligera. Las bisagras que tienen una sustitución C103S están ejemplificadas por las SEQ ID NO: 24-26.

Las proteínas de fusión Fc pueden comprender una secuencia de bisagra que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, un 60 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % con respecto a cualquier bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, una bisagra que tiene las SEQ ID NO: 88-92, o que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos de cualquier bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, una de las SEQ ID NO: 88-92. Las proteínas de fusión Fc pueden comprender una porción de bisagra que comprende al menos o como mucho 2, 5, 10, 12, 15, 18 o 20 residuos de aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 88-92, o una secuencia que comprende 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 5-10, 5-15, 5-20, 10-15, 10-20 o 15-20 residuos de aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 88-92. En algunos ejemplos de realizaciones, la secuencia de bisagra comprende un residuo de cisteína.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende una bisagra. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc puede comprender un dominio Fc unido a una proteína heteróloga, por ejemplo, en el formato Fc-X o X-Fc, sin que comprenda una bisagra o un núcleo de bisagra. En un ejemplo, una proteína de fusión Fc no comprende la secuencia EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 93) o una variante de la misma.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende un conector. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc puede comprender un dominio Fc que está unido directamente a una proteína heteróloga, por ejemplo, una proteína ^{10}Fn3 sin ninguna secuencia interviniente. En ciertas realizaciones, puede haber 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos (por ejemplo, 1-5 o 1-10 aminoácidos) entre el dominio Fc y la proteína heteróloga. Dichas proteínas de fusión Fc pueden ser proteínas de fusión X-Fc (la proteína heteróloga está unida en el N-terminal del Fc) o Fc-X (la proteína heteróloga está unida en el C-terminal del Fc), en las que X es la proteína heteróloga, y en las que X y Fc están unidos directamente entre sí.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc no comprende ni una bisagra ni un conector.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc es un dímero, en la que cada monómero comprende una proteína de fusión (un homodímero). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc es un heterodímero que comprende, por ejemplo, un monómero que comprende una proteína de fusión Fc y un monómero que comprende un Fc que no está unido a otra fracción. La porción Fc de un monómero puede comprender una o más modificaciones (o mutaciones) de aminoácidos con respecto a un Fc natural que favorecen la formación del dímero, por ejemplo, del heterodímero, con otro Fc. Por ejemplo, un Fc de un dímero puede comprender un "orificio" y el otro Fc del dímero puede comprender una "protuberancia" o un "bulto," según se describe, por ejemplo, en el documento WO96/027011; en el documento US 5.731.168 y en el documento US 5.821.333. Pueden usarse otras modificaciones, tales como modificaciones electrostáticas, para mejorar la formación del dímero. Algunos ejemplos de modificaciones se describen, por ejemplo, en el documento WO2007/110205; en el documento WO2009/089004 y en el documento WO2010/129304. Dichos cambios son particularmente útiles para mejorar la asociación de los dos monómeros heterólogos para formar un dímero, tal como un dímero que comprende un monómero que comprende una proteína de fusión Fc y un monómero que comprende una Fc que es diferente de la proteína de fusión Fc, por ejemplo, por la ausencia de una proteína heteróloga.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión Fc comprende un monómero que comprende la estructura X-Fc y un monómero que comprende la estructura Fc-X (o Fc-Y). Una proteína de fusión Fc también puede comprender dos monómeros, que comprenden cada uno la estructura X-Fc-X (una estructura en "quad"), según se usa, por ejemplo, en los Ejemplos 1-3. Una proteína de fusión Fc también puede comprender dos monómeros, que comprenden cada uno la estructura X-Fc-Y, o un monómero que comprende la estructura X-Fc-Y y un monómero que comprende la estructura Y-Fc-X. Cada monómero puede comprender opcionalmente un conector, y opcionalmente comprende una bisagra.

Una proteína de fusión Fc puede comprender un Fc de cadena única (scFc), en el que el primer y el segundo dominio Fc (o el primer y el segundo dominio de bisagra-Fc) están unidos a través de un conector. En una realización, un scFc comprende, en orden desde el N- hacia el C-terminal, un primer dominio CH2, primer dominio CH2 que está unido a un primer dominio CH3, dominio CH3 que está unido a un conector Fc, conector Fc que está unido a un segundo dominio CH2, segundo dominio CH2 que está unido a un segundo dominio CH3, en los que el primer y el segundo dominio CH2 y CH3 se asocian para formar un Fc dimétrico. Un scFc puede comprender en orden desde el N- hacia el C-terminal, una primera bisagra, primera bisagra que está unida a un primer dominio CH2, primer dominio CH2 que está unido a un primer dominio CH3, primer dominio CH3 que está unido a un conector Fc, conector Fc que está unido a una segunda bisagra, segunda bisagra que está unida a un segundo dominio CH2, segundo dominio CH2 que está unido a un segundo dominio CH3, en los que la primera y la segunda bisagra, los dominios CH2 y los dominios CH3 se asocian para formar un Fc dimérico. Los scFc se describen, por ejemplo, en el documento WO2008/131242, en el documento WO2008/143954 y en el documento WO2008/012543.

Ejemplos de conectores para conectar una proteína heteróloga con una fracción Fc

Puede usarse cualquier conector para unir covalentemente una proteína heteróloga, por ejemplo, una fracción de soporte basada en fibronectina, a una fracción Fc, con la condición de que el conector permita que la proteína de fusión que comprende la proteína heteróloga se pliegue adecuadamente y sea biológicamente activa. Por ejemplo, la proteína de fusión debería ser capaz de unirse eficazmente a su objetivo, y puede tener una semivida sérica larga con respecto a la proteína heteróloga que no está unida a un Fc. Un conector también es preferentemente esencialmente no inmunógeno y no reactivo con otras proteínas (es decir, químicamente inerte).

Un conector puede tener 1-6, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 5-10, 5-15, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45 o 5-50 aminoácidos de longitud.

Algunos ejemplos de conectores pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, conectores de GS, por ejemplo, $(GS)_1$, $(GS)_2$, $(GS)_3$, $(GS)_4$, $(GS)_5$, $(GS)_6$, $(GS)_7$, $(GS)_8$, $(GS)_9$ o $(GS)_{10}$. Los conectores también pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, conectores de G_4S, por ejemplo, $(G_4S)_1$, $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$ o $(G_4S)_5$. Algunos ejemplos adicionales de conectores se proporcionan en el documento WO2012/142515.

Ejemplos de proteínas de fusión Fc que pueden ser replegadas

Las proteínas de fusión que comprenden una fracción heteróloga X, por ejemplo, ^{10}Fn3, y una fracción Fc, se denominan en conjunto en el presente documento fusiones X/Fc, independientemente de si contienen un conector o una bisagra, e independientemente de la orientación (la "/" indica que cubre ambas orientaciones, es decir, cuando el Fc es N-terminal o cuando el Fc es C-terminal con respecto a X).

En ciertas realizaciones, un Fc está unido directamente a X, es decir, sin ningún aminoácido interviniente (por ejemplo, sin ningún conector). En cierta realización, un Fc está unido indirectamente a X, es decir, con uno o más aminoácidos intervinientes, por ejemplo, un conector.

Algunos ejemplos de proteínas de fusión son como sigue, y se muestran en el orden desde el N- hasta el C-terminal:

X-bisagra-CH2-CH3; X-conector-bisagra-CH2-CH3; X-CH2-CH3; X-conector-CH2-CH3; bisagra-CH2-CH3-X; bisagra-CH2-CH3- conector-X; CH2-CH3-Fc; CH2-CH3-conector-X, en las que X es una proteína heteróloga con respecto a la porción Fc. En cualquier orientación, las X/proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento pueden contener adicionalmente una metionina N-terminal y/o una secuencia líder (por ejemplo, para su expresión en células de mamífero).

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte basada en fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29; y (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86, en las que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K_d de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte basada en fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte basada en fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las de la SEQ ID NO: 1-29; (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86; y (iii) un conector que une covalentemente la fracción de soporte basada en fibronectina a la fracción Fc, en el que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K_d de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte basada en fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende (i) una fracción de soporte basada en fibronectina que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29, (ii) una fracción Fc, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a las SEQ ID NO: 65-86; y (iii) un conector que une covalentemente la fracción de soporte basada en fibronectina a la fracción Fc, en el que el conector comprende 1-10 aminoácidos, tal como 6 aminoácidos, y en el que la proteína de fusión se une específicamente a un objetivo (por ejemplo, con una K_d de menos de 500 nM, de 100 nM, de 50 nM, de 10 nM, de 5 nM, de 1 nM, de 500 pM, de 100 pM o menos) que no está unida por una fracción de soporte basada en fibronectina natural (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8, 10, 12, 14 o 16). Algunos ejemplos de fracciones de soporte basadas en fibronectina unidas a un Fc se desvelan en el documento WO2012/142515.

También se proporcionan en el presente documento composiciones de proteína, por ejemplo, composiciones que comprenden una o más proteínas en una de las soluciones o los tampones descritos en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas (en las que, por ejemplo, la proteína es un dímero que comprende una cisteína en cada dímero) que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y agua, en las que la composición no comprende una cantidad significativa de un tampón o de un agente desnaturalizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una suspensión de proteínas desnaturalizadas, en las que al menos algunos proteínas comprenden al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y en las que la composición no comprende un tampón o un agente desnaturalizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. Adicionalmente se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 10 y 13, en las que la composición no comprende un agente desnaturalizante y opcionalmente no comprende un agente reductor. También se proporcionan composiciones que comprenden una proteína que comprende al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en las condiciones apropiadas, y un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de pH de entre 9 y 11 y un agente oxidante, en las que la composición no comprende un agente reductor distinto a un agente reductor que parte de un agente oxidante que está presente en la composición. La concentración de proteínas en cualquiera de estas composiciones puede ser al menos de 20 mg/ml, de 15 mg/ml, de 10 mg/ml, de 5 mg/ml o de 1 mg/ml. Las composiciones pueden comprender al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de la proteína de interés, por ejemplo, una fracción de soporte basada en fibronectina unida a un Fc, con respecto a la cantidad total (por ejemplo, en mg/ml) de proteína en la composición. En la composición que comprende un tampón de replegado, la proteína replegada puede constituir al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, 98 % o un 99 % de la proteína de la muestra.

Síntesis de las proteínas

Las proteínas que pueden ser replegadas según se describe en el presente documento pueden ser sintetizadas según cualquier método conocido en la materia. Algunas células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, de levaduras o de mamífero, o células bacterianas. Algunas bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o Bacillus spp. También pueden usarse levaduras, preferentemente de la especie *Saccharomyces*, tal como S. *cerevisiae,* para la producción de polipéptidos. También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar las proteínas recombinantes. Los sistemas de

baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son analizados por Luckow y Summers, (Bio/Technology, 6: 47, 1988). Las proteínas purificadas pueden prepararse mediante el cultivo en sistemas de hospedador/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. Las proteínas expresadas, por ejemplo, las proteínas de soporte basado en fibronectina, pueden purificarse después a partir del medio de cultivo o de los extractos celulares.

Las proteínas pueden ser sintetizadas químicamente, enzimáticamente o recombinantemente. Las proteínas también pueden producirse usando sistemas de traducción exentos de células. Para dicho propósito, los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión deben ser modificados para permitir una transcripción *in vitro* para producir el ARNm y permitir una traducción exenta de células del ARNm en el sistema exento de células en particular que se esté utilizando (eucariota, tal como un sistema de traducción exento de células de mamífero o de levadura, o procariota, tal como un sistema de traducción exento de células bacteriano). Para una síntesis química, véanse, por ejemplo, los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2º ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

El uso de codones puede seleccionarse de forma que mejore la expresión en una célula. Dicho uso de los codones dependerá del tipo de célula seleccionado. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como para células de mamífero, células vegetales, células de levadura y células de insecto. Véase, por ejemplo: Mayfield et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 21 de enero de 2003; 100 (2): 438-42; Sinclair et al. Protein Expr Purif. Octubre de 2002; 26 (1): 96-105; Connell ND. Curr Opin Biotechnol. Octubre de 2001; 12 (5): 446-9; Makrides et al. Microbiol Rev. Septiembre de 1996; 60 (3): 512-38; y Sharp et al. Yeast. Octubre de 1991; 7 (7): 657-78.

Las técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, o en F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing y Wiley-Interscience: Nueva York, 1987) y sus actualizaciones periódicas. El ADN que codifica el polipéptido está unido operativamente a elementos reguladores de la transcripción o de la traducción adecuados, procedentes de genes de procariotas, de mamíferos, de virus o de insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para el control de la transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión ribosómicos del ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y de la traducción. Adicionalmente se incorpora la capacidad para replicarse en un hospedador, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección, para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

Las proteínas pueden comprender una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia de señalización heteróloga seleccionada preferentemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señalización) por parte de la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen ni procesan una secuencia de señalización nativa, la secuencia de señalización puede ser sustituida por una secuencia de señalización procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, de la penicilinasa, del lpp o de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la secuencia de señalización nativa puede ser sustituida, por ejemplo, por la líder de la invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo los líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*) o el líder de la fosfatasa acida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la Publicación PCT nº WO90/13646. Para la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias de señalización de mamífero, así como los líderes de secreción víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex. El ADN de dichas regiones precursoras puede estar ligado en marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, denominado también marcador seleccionable. Algunos genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxótrofas o (c) proporcionan nutrientes críticos que no están disponibles en el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa de D-alanina para bacilos.

Los vectores de expresión y de clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que está unido operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. Algunos promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores de beta-lactamasa y de lactosa, de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica la proteína.

El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de etiqueta de la proteína que puede ser útil para la purificación de las proteínas de fusión. Algunos ejemplos de etiquetas de proteínas incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta de histidina, una etiqueta de FLAG, una etiqueta de myc, una etiqueta de HA o una etiqueta de GST. Algunos vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores de células bacterianas, fúngicas, de levadura y de mamífero puede encontrarse en Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, Nueva

York, 1985).

La construcción de expresión puede ser introducida en la célula hospedadora usando un método apropiado para la célula hospedadora, como será evidente para el experto en la materia. En la materia se conocen diversos métodos para la introducción de ácidos nucleicos en células hospedadoras, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (cuando el vector es un agente infeccioso).

La expresión en células bacterianas puede llevarse a cabo esencialmente como sigue o con ciertas variaciones de lo mismo. Se inserta el ADN que codifica una proteína de interés, por ejemplo, una proteína ^{10}Fn3/Fc, en el vector pET9d (EMD Bioscience, San Diego, CA) y se expresa en células de *E. coli* HMS174. Se usan veinte ml de un cultivo de inóculo (generado a partir de una única colonia en placa) para inocular 1 litro de medio LB que contiene 50 µg/ml de carbenicilina y 34 µg/ml de cloronfenicol. El cultivo se cultiva 37 ºC hasta una A_{600} de 0,6-1,0. Después de la inducción con isopropil-β-tiogalactósido 1 mM (IPTG), el cultivo se cultiva durante 4 horas a 30 ºC y se recoge mediante una centrifugación durante 30 minutos a ≥ 10.000 g a 4 ºC. Los sedimentos de células se congelan a -80 ºC. El sedimento de células se resuspende en 25 ml de tampón de lisis (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, 1x de cóctel inhibidor de la proteasa completo exento de EDTA (Roche), PMSF 1 mM, a un pH de 7,4) usando un homogeneizador Ultra-turrax (IKA works) en hielo. La lisis celular se consigue mediante una homogeneización a alta presión (≥ 18.000 psi) usando un Modelo M-110S de MICROFLUIDIZER® (Microfluidics). La fracción insoluble se separa mediante una centrifugación durante 30 minutos a 23.300 g a 4 ºC. El sedimento insoluble recuperado a partir de la centrifugación del lisado se lava con fosfato de sodio 20 mM / NaCl 500 mM, a un pH de 7,4. El sedimento puede lavarse opcionalmente adicionalmente con agua, y suspenderse en una solución en suspensión como se describe adicionalmente en el presente documento. Otros métodos se describen en el documento WO2012/142515.

Las proteínas pueden ser purificadas mediante los métodos de aislamiento/purificación para proteínas conocidos de forma general en el ámbito de la química de proteínas. Algunos ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, precipitación salina (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, adsorción cromatografía, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía en fase normal, cromatografía en fase inversa, filtración en gel, cromatografía de penetración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente o cualquier combinación de éstas. Después de la purificación, las proteínas pueden ser intercambiadas en diferentes tampones y/o concentradas mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, filtración y diálisis. Algunos métodos para la expresión de proteínas de fusión en *E. coli* también se proporcionan en el documento WO2012/142515.

La proteína purificada puede ser un 85 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína puede ser lo suficientemente pura como para su uso en forma de un producto farmacéutico.

Ejemplos de usos

En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas, por ejemplo, proteínas de fusión, que comprenden una fracción de soporte basada en fibronectina, útil en el tratamiento de trastornos. Las enfermedades o los trastornos que pueden ser tratados estarán dictados por la especificidad de unión de la fracción de soporte basada en fibronectina. Según se describe en el presente documento, las fracciones de soporte basadas en fibronectina pueden estar diseñadas para unirse a cualquier objetivo de interés. Algunos ejemplos de objetivos incluyen, por ejemplo, el TNF-alfa, el VEGFR2, la PCSK9, la IL-23, el EGFR y el IGF1R. Simplemente como un ejemplo, las fracciones de soporte basadas en fibronectina que se unen al TNF-alfa pueden usarse para el tratamiento de trastornos autoinmunes tales como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del intestino, la psoriasis y el asma. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento también pueden usarse para el tratamiento del cáncer.

La solicitud también proporciona métodos para la administración de las proteínas a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, las proteínas son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular un ser humano. Una composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que es administrada a un animal sin unas consecuencias médicas adversas significativas. Algunos ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones, por ejemplo, que comprenden una fracción de soporte basada en fibronectina, que están esencialmente exentas de endotoxinas o de pirógenos o que tienen unos niveles muy bajos de endotoxinas o de pirógenos.

SECUENCIAS

Dominio ^{10}Fn3 natural:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 1)

Dominio ^{10}Fn3 de la SEQ ID NO: 1 (con D97E)

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEKPSQ (SEQ ID NO: 2)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 1:

LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT ISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINY (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 2:

EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATI SGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 4)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 3:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 4:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTE (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 5:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 6:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEID (SEQ ID NO: 8)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 versión 7 (versión 6 con D97E):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIE (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 8:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDK (SEQ ID NO: 10)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 versión 9 (versión 8 con D97E):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 11)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 10:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKP (SEQ ID NO: 12)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 versión 11 (versión 10 con D97E):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEKP (SEQ ID NO: 13)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural versión 12:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPS (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 versión 13 (versión 12 con D97E):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIEKPS (SEQ ID NO: 15)

Dominio ^{10}Fn3 natural con la sustitución D80E

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 16)

Degenerada

Secuencia de núcleo del dominio ^{10}Fn3 natural:

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRT (SEQ ID NO: 17)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTE (SEQ ID NO: 18)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEI (SEQ ID NO: 19)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEID (SEQ ID NO: 20)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIE (SEQ ID NO: 21)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIDK (SEQ ID NO: 22)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 23)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIDKP (SEQ ID NO: 24)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIEKP (SEQ ID NO: 25)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIDKPS (SEQ ID NO: 26)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIEKPS (SEQ ID NO: 27)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 28)

VSDVPRDLEVVAA$(X)_u$LLISW$(X)_v$YRITY$(X)_w$FTV$(X)_x$ATISGL$(X)_y$YTITVY A$(X)_z$ISINYRTEIEKPSQ (SEQ ID NO: 29)

MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 30)
GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 31)
X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 32)
X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 33)
X_nVPRDL (SEQ ID NO: 34)
X_nPRDL (SEQ ID NO: 35)
X_nRDL (SEQ ID NO: 36)
X_nDL (SEQ ID NO: 37)
MASTSG (SEQ ID NO: 38)
EIEK (SEQ ID NO: 39)
EGSGC (SEQ ID NO: 40)
EIEKPCQ (SEQ ID NO: 41)
EIEKPSQ (SEQ ID NO: 42)
EIEKP (SEQ ID NO: 43)
EIEKPS (SEQ ID NO: 44)
EIEKPC (SEQ ID NO: 45)
HHHHHH (SEQ ID NO: 46)
EIDK (SEQ ID NO: 47)
EIDKPCQ (SEQ ID NO: 48)
EIDKPSQ (SEQ ID NO: 49)

MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGSDGRVKEFTVPPS VSSATITGLKPGTEYTISVIALKDNQESEPLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 50)

TPSS (SEQ ID NO: 51)
TPPRVQI (SEQ ID NO: 52)
VGSDGR (SEQ ID NO: 53)
PSVS (SEQ ID NO: 54)
GLKPG (SEQ ID NO: 55)
KDNQESEP (SEQ ID NO: 56)

LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPS STSVTITGITPGVEYVVSVYALKDNQESPPLVGTCTT (SEQ ID NO: 57)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 58)

TEDS (SEQ ID NO: 59)
TAPDAAF (SEQ ID NO: 60)
SEKVGE (SEQ ID NO: 61)
GSER (SEQ ID NO: 62)
GLKPG (SEQ ID NO: 63)
KGGHRSN (SEQ ID NO: 64)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 65)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67)

EPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 69)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 71)

EPRSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 72)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS

DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLGSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77)

EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLGSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 79)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 80)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLAPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNAYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 83)

EPKSSDKTHTSPPSPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALGSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)

EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALGSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 85)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)

DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 87)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 88)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 89)
EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 90)
DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 91)
DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 92)
EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 93)

Los siguientes Ejemplos representativos contienen una importante información adicional, de ejemplificación y de guía que puede ser adaptada a la práctica de esta invención en sus varias realizaciones y los equivalentes de las mismas. Estos ejemplos pretenden ayudar a ilustrar la invención y no pretenden, ni deberían ser interpretados como, limitantes de su ámbito.

Ejemplos

Ejemplo 1: cribado de alto rendimiento de las condiciones del tampón para el replegado de proteínas desnaturalizadas

Con objeto de identificar las condiciones de replegado eficaces para las proteínas ^{10}Fn3/de fusión Fc producidas en *E. coli,* se usó una plataforma automatizada de manipulación de líquidos para ejecutar el replegado de la proteína mediante una dilución por triplicado en placas de 96 pocillos.

Se produjo la biomasa de una proteína ^{10}Fn3/Fc en un fermentador de 10 l. La biomasa se recogió y los CI se recuperaron y se lavaron mediante una centrifugación antes de ser congelados.

El estudio de cribado se centraba en la concentración de proteína, el tampón de resolubilización, el pH de replegado, la temperatura, los excipientes para la supresión de la agregación y los excipientes redox. Se usó el programa informático JMP Design of Experiments (DoE) para diseñar el estudio de cribado y analizar los datos. Los datos fueron recogidos usando un lector de placas y una SE-HPLC. Los datos sugirieron que un tampón de resolubilización a un pH de aproximadamente 8 con guanidina y un tampón de replegado con arginina para suprimir la agregación, y un sistema redox de Glutatión, a un pH de aproximadamente 10, favorecían la formación de una proteína soluble. Además, estas condiciones mostraron una proteína alrededor del peso molecular correcto en disolución, lo que indicaba la formación de puentes de disulfuro, necesaria para formar el homodímero ^{10}Fn3/Fc.

El escalado de la dilución de replegado hasta unos volúmenes de replegado finales de 50 ml, de 100 ml y de 200 ml usando las condiciones identificadas anteriormente se llevó a cabo usando una bomba y una mezcla calibradas. Se observó un acontecimiento de precipitación variable e importante en todos los casos, y se observó una baja recuperación de proteína. Únicamente se recuperó aproximadamente entre el 10 y el 20 % de la proteína en disolución, y se encontró que tenía el peso molecular apropiado. Para un subconjunto de diluciones de replegado a escala de laboratorio, se encontró que la mayoría de la proteína recuperada en disolución tenía un peso molecular menor, correspondiente al monómero ^{10}Fn3/Fc, e indicando que no se habían formado los puentes de disulfuro. Con estos datos, se determinó que deberían ser evaluados unos métodos de replegado alternativos para las moléculas de

^{10}Fn3/Fc.

Ejemplo 2: efecto del pH sobre el replegado de las proteínas de los CI

Este Ejemplo describe que la eficacia de replegado de las proteínas de fusión Fc desnaturalizadas varía según el pH del tampón usado para el replegado de las proteínas, y que el replegado es más eficaz a un pH mayor que a un pH menor.

Se analizó la eficacia de replegado de una proteína de fusión Fc en diferentes condiciones usando una cromatografía en Sephadex G25. En resumen, se acondiciona una columna con tampón de replegado, tras lo cual se añaden los CI solubilizados a la columna y se recupera la proteína de los CI haciendo pasar a través de la columna el mismo tampón de replegado que el usado para el acondicionamiento de la columna.

La proteína de fusión Fc usada era una molécula de ^{10}Fn3/Fc que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
MG*VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVPPSDDYGYYRITYGETGGNSPVQEFTVPIGKGTA*
*TISGLKPGVDYTITVYAVEFPWPHAGYYHRPISINYRTEI*EPKSSGSTHTCPPCPAPELL
GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94; la secuencia ^{10}Fn3 se muestra en cursiva).

Se expresó la proteína ^{10}Fn3/Fc en *E. coli* y se recogieron los CI. Los CI se solubilizaron a una proporción de peso (gramos):volumen (ml) de 1:20 en Tris 50 mM a un pH de 8,0, GuHCl 6,0 M, TCEP 0,2 mM. La reacción de solubilización se mezcló hasta que se produjo la solubilización completa de los CI. La reacción de solubilización se mezcló después con un volumen 2x de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4, y se cargaron 10 ml de la misma en columnas de 2,5 x 10 cm con Sephadex G25 a 150 cm/h. Las columnas de Sephadex G25 se acondicionaron con tampón de replegado que consiste en arginina 0,4 M y Tris 50 mM a un pH de 8,5, de 9,0 o de 10,4 mediante la adición de un 10 % del volumen equivalente de la columna en tampón de replegado a la columna a 150 cm/h hasta que se consiguió un pH basal estable. La absorbancia del eluído se monitorizó a 280 nm y el principal pico de absorbancia de cada columna se recogió para un análisis adicional.

Los cromatogramas de los experimentos realizados a un pH de 8,5, de 9,0 y de 10,4 se muestran en las Figuras 2A, B y C, respectivamente. En los cromatogramas pueden visualizarse agregados y precipitados de la proteína en forma de desplazamientos de los picos o como picos de las bandas de NaOH. El cromatograma del experimento de replegado realizado a un pH de 8,5 (Figura 2A) muestra un desplazamiento significativo, así como un pico de la banda del NaOH, mientras que los cromatogramas de los experimentos de replegado realizados a un pH de 9,0 y de 10,4 (Figuras 2B y C, respectivamente) muestran una buena simetría entre los picos y ningún pico de la banda del NaOH, lo que indica una menor agregación y precipitación de la proteína, y una mayor solubilidad de las proteínas a un pH de 9,0 y de 10,4 que a un pH de 8,5. Al usarse la solubilidad como un indicador del adecuado replegado de la proteína en estos experimentos, los resultados indican que el replegado de la proteína desnaturalizada a un pH de 9,0 y de 10,4 es más eficaz que a un pH de 8,5.

También se analizó la eficacia de replegado a diferentes valores de pH mediante una SDS PAGE. Este método muestra proteína agregada soluble, que también es indicativa de un mal replegado de la proteína. Se diluyeron 10 µl de proteína de los principales picos de absorbancia que eluyeron de las columnas de Sephadex G25 descritas anteriormente, con 20 µl de agua y 10 µl de tampón de muestra LDL, y se cargaron 30 µl de la muestra diluida en un Bis-Tris Gel (Novex) de 10 pocillos al 4-12 %. El gel se analizó a 200 V durante 35 minutos. El gel se aclaró con agua durante 10 minutos, se tiñó durante una noche con una tinción azul thermo gelcode y se destiñó durante 3 horas antes del barrido.

Los geles teñidos se muestran en las Figuras 3A y B. Estos indican que hay presente un significativo agregado soluble en el replegado realizado a un pH de 9,0, mientras que a un pH de 10,4 hay presente un agregado menos soluble y hay más dímero presente, lo que sugiere que el replegado y la formación del dímero son más eficientes a un pH mayor.

Ejemplo 3: no es necesario un agente reductor durante el replegado

Ciertos métodos para el replegado de proteínas que comprenden puentes de disulfuro usan dos etapas de replegado: una primera etapa de replegado durante la cual se usa un agente reductor, por ejemplo, TCEP, para mantener una conformación reducida de las cisteínas, para replegar en primer lugar los monómeros; y una segunda etapa de replegado durante la cual se forman los puentes de disulfuro, para dimerizar los monómeros apropiadamente formados. En este Ejemplo se investigó la necesidad de incluir un agente reductor durante una primera etapa de replegado, y los resultados demuestran que no es necesario un agente reductor para obtener un replegado eficaz de una proteína desnaturalizada.

Se llevó a cabo el mismo experimento al descrito en el Ejemplo 2 con el tampón de replegado a un pH de 10,4.

Después se incubó la proteína del principal pico de absorbancia a la temperatura ambiente durante 30 minutos o 4 horas en el mismo tampón (es decir, en ausencia de TCEP), antes de ser cargada en un gel de SDS-PAGE. El gel se cargó y se analizó, y se tiñó esencialmente según se describe en el Ejemplo 2.

El gel de SDS-PAGE teñido se muestra en las Figuras 4A y B. Los resultados demuestran que no se produce la formación del dímero en ausencia de TCEP incluso después del tiempo de incubación más largo (4 horas). Este hallazgo sugiere que no es necesario incluir un agente reductor, por ejemplo, TCEP, durante la primera etapa de replegado. Además, la eliminación del TCEP de los procedimientos de replegado de la ^{10}Fn3/Fc dio como resultado una reducción significativa del contenido de bucles CH3 abiertos de las preparaciones de ^{10}Fn3/Fc.

Ejemplo 4: la primera etapa de replegado se produce rápidamente

Este Ejemplo demuestra que el replegado de la proteína desnaturalizada durante la primera etapa de replegado se produce rápidamente, y por lo tanto no es necesario un largo tiempo de incubación antes de la segunda etapa de replegado (oxidante).

Si se requiere un replegado apropiado del monómero antes de la correcta formación del dímero y la velocidad de replegado del monómero es baja, puede ser necesario llevar a cabo la etapa de replegado del monómero (es decir, la etapa de replegado 1) durante bastante tiempo. Los resultados de los experimentos de replegado con G25 descritos en los Ejemplos 1 y 2, parecen demostrar, sin embargo, que el apropiado replegado de las ^{10}Fn3/Fc puede llevarse a cabo usando una eliminación prácticamente instantánea del desnaturalizante (es decir, una etapa de replegado 1 corta). El actual Ejemplo confirma esta observación mediante la prueba de diferentes tiempos de incubación para la etapa de replegado 1.

Se llevó a cabo el mismo experimento al descrito en el Ejemplo 2 con el tampón de replegado a un pH de 10,4. Después se incubó la proteína del principal pico de absorbancia a la temperatura ambiente durante 0, 1 hora o 2 horas tanto según eluyó como después de diluir la a 1:1 con tampón de replegado de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4. Después de la incubación, a continuación se añadió a las muestras glutatión a una concentración de 1:0,2 mM de oxidado:reducido. Las reacciones se incubaron después durante otras 3 horas a la temperatura ambiente. Después se llevó a cabo la SDS-PAGE esencialmente según se describe en el Ejemplo 2.

Los geles teñidos, que se muestran en la Figura 5, indican que aparecieron unos niveles similares de formación de dímero en todas las muestras independientemente del tiempo de incubación de las muestras (correspondiente a la etapa de replegado 1), lo que sugiere que el replegado se produce rápidamente después de la eliminación del agente desnaturalizante. Aunque el replegado se produjo en ambas muestras, las eluídas directamente desde la columna y las diluidas a 1:1 con tampón de replegado, parece que la formación del dímero es más eficaz en las muestras diluidas.

Ejemplo 5: solubilización de los CI a un elevado pH en ausencia de clorhidrato de guanidina

Este Ejemplo demuestra que los CI pueden ser solubilizados en un tampón que tiene un elevado pH en ausencia de un agente desnaturalizante, tal como clorhidrato de guanidina.

Se exploró la eficacia de solubilización de la ^{10}Fn3/Fc de los CI en tampón de solubilización con unos valores de pH de desde 10,4 hasta 12,5. Se añadieron los CI de la misma proteína que en los Ejemplos previos a un volumen 20x de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4. Se inició la mezcla y el pH se ajustó lentamente con NaOH 12 M hasta que se solubilizaron todos los CI. El pH de la solución en la solubilización era un pH de 12,2.

Experimentos posteriores exploraron la reducción del pH de la solubilización usando prolina y glicina como aditivos. La única condición al pH más bajo que solubilizaba con éxito los CI en un periodo de tiempo razonable era Tris 50 mM, arginina 0,5 M, prolina 0,1 M a un pH de 10,7. La solubilización tardó 20 minutos en esta solución. Por lo tanto, a unos valores de pH más bajos, eran necesarios los aditivos para solubilizar completamente los CI, y la solubilización tardó bastante más tiempo que a un pH mayor. Se averiguó que la solubilización a un pH de 12,2 durante 3-5 minutos solubilizaba esencialmente todos los CI de la reacción.

Ejemplo 6: caracterización del estado de plegamiento de la proteína a diferentes pH

Este Ejemplo demuestra que al menos la estructura terciaria parcial de una proteína ^{10}Fn3/Fc se mantiene durante la solubilización de los CI a un elevado pH, pero no en una solución de guanidina 6 M.

Para determinar si una proteína ^{10}Fn3/Fc conserva su estructura secundaria y terciaria durante la solubilización a un elevado pH, se usó un dicroísmo circular (DC) de UV lejano y próximo.

Se expresó una proteína ^{10}Fn3/Fc que comprende un Fc de la IgG1 humana unido a un N-terminal de una fracción ^{10}Fn3 que se une a un objetivo diferente al que se une la molécula usada en los Ejemplos 2-5 en *E. coli* y se aislaron los CI. El Fc tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 95).

Dado que la arginina no es compatible con un DC, se usó un tampón de solubilización diferente al del Ejemplo 5. Se diluyó una muestra purificada de alta concentración de la proteína ^{10}Fn3/Fc en los siguientes tampones a una concentración final de 1 g/ml: fosfato 50 mM a un pH de 7,2; Tris 50 mM a un pH de 8,0; carbonato 50 mM a un pH de 10,2; fosfato 50 mM a un pH de 12,2; Tris 50 mM a un pH de 8,0 + GuHCl 6 M. Una muestra de proteína diluida en fosfato 50 mM a un pH de 12,2 se ajustó de nuevo a un pH de 7,5 usando ácido clorhídrico. Las muestras se sometieron a un DC de UV lejano y próximo.

Los resultados, que se muestran en las Figuras 6A y B, indican que a un elevado pH se mantiene parte de la estructura terciaria, mientras que con guanidina 6 M se pierde toda la estructura secundaria y terciaria (véanse las Figuras 6A y B). A un pH de 10,4 se mantiene la mayor parte de la estructura secundaria y terciaria. Al llevar la proteína desde un pH de 12,2 hasta un pH de pH 7,5 apareció un replegado parcial de la molécula. Por lo tanto, los resultados indican que una proteína desnaturalizada que es solubilizada en un tampón de solubilización a un elevado pH, pero en ausencia de un agente desnaturalizante, conserva parte de la estructura terciaria, y esto puede facilitar el replegado de la proteína con respecto a un método de solubilización/replegado que usa un agente desnaturalizante, tal como clorhidrato de guanidina.

Ejemplo 7: solubilización de los CI a elevado pH y replegado de las proteínas ^{10}Fn3/Fc

Este Ejemplo describe un método para la solubilización y el replegado de proteínas desnaturalizadas en ausencia de un agente desnaturalizante. El método se usó para solubilizar y replegar varias proteínas ^{10}Fn3/Fc diferentes, algunas de las cuales estaban en el formato ^{10}Fn3-Fc y otras en el formato Fc-^{10}Fn3.

Todas las etapas se llevaron a cabo a la temperatura ambiente. Se suspendieron 15 gramos de los CI en 30 ml de agua Milli Q. La suspensión se mezcló hasta que se observó un aspecto uniforme, y después se apartó.

El tampón de solubilización se preparó mediante la adición de 1,398 ml de NaOH 12,5 M a 300 ml de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4. El pH final después de la adición era de 12,2.

El tampón de replegado se preparó como sigue. Se añadió un total de 0,915 g de glutatión oxidado y 0,0915 g de glutatión reducido a 900 ml de Tris 50 mM pH, arginina 0,4 M un pH de 10,4. Se añadió un total de 1,701 ml de HCl 12,0 M en el tampón de replegado + glutatión.

La Tabla 1 proporciona la cantidad de HCl que se debe añadir a varios volúmenes de tampón de replegado para conseguir un pH de aproximadamente 10,4.

Tabla 1: volúmenes de HCl 12 M que se deben añadir al tampón de replegado para obtener un pH de aproximadamente 10,4

Volumen de tampón de solubilización	Volumen de tampón de replegado a una dilución de 1:3	Volumen de HCl 12,0 M que se debe añadir al tampón de replegado antes de la dilución
1 ml	3 ml	5,67 µl
250 ml	750 ml	1,42 ml
750 ml	2,25 l	4,25 ml
1 l	3 l	5,67 ml

La solubilización se llevó a cabo como sigue. Se inició la mezcla de la suspensión de los cuerpos de inclusión en una placa con agitación. Se añadieron los 300 ml del tampón de solubilización a la suspensión de los CI en mezcla y se puso en marcha un cronómetro.

La mezcla de los 900 ml de tampón de replegado se inició a los 2 minutos.

Después de 2,5 minutos de la mezcla de la suspensión de los CI con el tampón de solubilización, la solución de solubilización en mezcla (o la reacción de solubilización) aparecía transparente y no había presentes CI intactos en la solución.

Después, la reacción de solubilización se vertió en el tampón de replegado en mezcla lo más rápido posible (< 5 segundos). La mezcla se continuó durante 30 segundos después de añadir la reacción de solubilización, de forma que se consiguió la mezcla completa de las dos soluciones.

Después, la reacción de replegado se retiró de la placa de agitación y se dejó reposar estática a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 1 hora, la reacción de replegado se puso de nuevo en la placa de agitación y se inició de nuevo la mezcla. Una vez producida la mezcla, se añadieron a la reacción de replegado 380 ml de una solución de HCl 0,1 M lo más rápido posible (< 5 segundos). En este punto se consiguió el replegado, y la proteína replegada puede ser cargada en la proteína A para su purificación.

Ejemplo 8: replegado de una proteína ^{10}Fn3/Fc

Este Ejemplo describe un método para la solubilización y el replegado de proteínas desnaturalizadas en ausencia de un agente desnaturalizante.

La pasta de células de la fase de inducción de la fermentación de un cultivo de *E. coli* que expresa la proteína ^{10}Fn3/Fc del Ejemplo 6 se extrajo del almacenamiento a -80 ºC y se suspendió en fosfato de sodio 20 mM a un pH de 6,2, cloruro de sodio 250 mM, EDTA 5 mM en una proporción de 1:10 (p/p de sólidos/tampón) usando un UltraTurrax. El material suspendido se pasó a través de un microfluidificador dos veces a una psi de 18.000. La suspensión fraccionada se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos para aislar la fracción insoluble. Esta fracción se resuspendió, se lavó y se aisló dos veces. El tampón de lavado era fosfato de sodio 20 mM a un pH de 6,2, cloruro de sodio 250 mM, EDTA 5 mM, 1 % de Triton X-100. El aislamiento se llevó a cabo a través de una centrifugación a 10.000 x g. Después se lavó el resto de la fracción insoluble dos veces más con agua DI. El aislamiento se llevó a cabo a través de una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. La fracción insoluble aislada (los CI) se almacenó a -20 ºC.

La proteína de fusión ^{10}Fn3/Fc de los CI fue replegada como sigue. Los CI congelados se descongelaron en agua RODI. Una vez que la solución de los CI era completamente homogénea, los CI se resolubilizaron mediante una dilución con Tris 50 mM arginina 0,4 M a un pH de 12,2 con agitación. Esta solución se dejó en agitación durante 2-5 minutos, hasta que se disolvió completamente y no había visibles partículas grandes. Después de la solubilización, la muestra se diluyó adicionalmente mediante la adición de Tris 50 mM arginina 0,4 M a un pH de 10,4, con la adición adicional de HCl 12 M para llevar el pH de la solución hasta 10,4. Para replegar la proteína se llevó a cabo una reacción redox usando una proporción de 1 mM:0,2 mM de glutatión oxidado y reducido. La reacción redox se dejó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de 1 hora, el pH de la reacción había caído hasta un pH de aproximadamente 8,0 con la adición de 0,3x volúmenes de HCl 1 M.

Ejemplo 9: efecto de la concentración de proteínas sobre la eficacia de la solubilización y el replegado a un elevado pH

Este Ejemplo demuestra que puede usarse el método a elevado pH para la solubilización y el replegado de una proteína desnaturalizada con unas concentraciones de proteínas de hasta al menos 7 mg/ml.

Se usó el método de solubilización a un elevado pH descrito en los Ejemplos 7 y 8 para el replegado de la proteína ^{10}Fn3/Fc (usada en los Ejemplos 5 y 7) a 1,75, 3,5 y 7 mg/ml. La concentración de proteínas se determinó en la fase de solubilización y se ajustó para la dilución posterior. La concentración se midió mediante una absorbancia a 280 nm. Se sometieron 10 o 20 µg de la proteína replegada a un análisis mediante una SDS-PAGE. El gel, que se muestra en la Figura 7, indica que se produjo la formación del dímero a cada una de estas concentraciones. Por lo tanto, unas concentraciones de proteína de hasta al menos 7 mg/ml en la fase de solubilización pueden ser replegadas usando este método. Sin embargo, la formación del dímero era más eficaz a unas concentraciones de replegado más bajas.

Ejemplo 10: control de la desamidación que se produce a un elevado pH

Una preocupación del uso de un elevado pH para solubilizar y replegar las ^{10}Fn3/Fc es la desamidación de la proteína. Este Ejemplo demuestra que la limitación en el tiempo de incubación a un elevado pH para la solubilización reduce la desamidación.

En experimentos tempranos se llevó a cabo una solubilización a un pH de 12,2 según se describe en los Ejemplos 7 y 8 durante una hora a la temperatura ambiente, y el replegado (a un pH de 10,4) se incubó durante una noche a la temperatura ambiente. El replegado mostró la formación de Isoasp en una cantidad del 28,1 % y del 17,8 % de desamidación mediante una digestión con lys-C, seguido de un análisis del mapa peptídico.

Para intentar reducir los niveles de desamidación, se realizaron una solubilización y un replegado, llevados a cabo como en los Ejemplos 7 y 8 con la proteína ^{10}Fn3/Fc del Ejemplo 5, con un tiempo de solubilización de 5 minutos y un replegado de 18-20 horas a un pH de 10,4. La proteína replegada mostró únicamente un 5,6 % de iso-asp, un 3,7 % de desamidación y un 2,7 % de imida mediante un mapa peptídico de lys-C.

Por lo tanto, al minimizar la exposición a ambos pH de 12,2 durante la solubilización, y al pH de 10,4 en el tampón de replegado, se minimizó la desamidación. El método de solubilización y replegado a elevado pH puede proporcionar más control sobre el tiempo de replegado y por lo tanto de la desamidación, considerando que no es necesaria la eliminación del desnaturalizante químico, y simplemente una reducción del pH reducirá la desamidación.

Ejemplo 11: determinación del pH de la reacción de solubilización y de replegado

Este Ejemplo describe el pH de las reacciones de solubilización y de replegado cuando se lleva a cabo el método de solubilización y replegado descrito en los Ejemplos 7 y 8.

La proteína ^{10}Fn3/Fc usada en los Ejemplos 6 y 7 fue expresada en *E. coli* y se obtuvieron los CI. Se suspendieron 0,5 gramos de los CI en 1 ml de agua Milli Q. La suspensión se mezcló hasta que se observó un aspecto uniforme, y después se apartó.

El tampón de solubilización se preparó mediante la adición de 46,6 µl de NaOH 12,5 M a 10 ml de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4. El pH final de este tampón de solubilización era de 12,3.

Se añadió un total de 0,0305 g de glutatión oxidado y 0,003 g de glutatión reducido a 30 ml de Tris 50 mM, arginina 0,4 M a un pH de 10,4. El pH final de este tampón de replegado era de 10,4.

Se añadió un total de 56,7 µl de HCl 12,0 M al tampón de replegado que contiene el glutatión.

Se añadió la totalidad de los 10 ml de tampón de solubilización a la suspensión de los CI. Después de 3 minutos, la solución de solubilización en mezcla parecía transparente y no había presentes CI intactos en la solución. El pH de esta reacción de solubilización era de 12,5.

Después se vertió la reacción de solubilización de replegado en mezcla lo más rápido posible (menos de 5 segundos). Se continuó la mezcla durante 30 segundos después de añadir la reacción de solubilización, de forma que se consiguiera la mezcla completa de las dos soluciones. El pH de esta reacción de replegado era de 10,3.

Todas las etapas del método descrito en este Ejemplo se llevaron a cabo a la temperatura ambiente.

Por lo tanto, el pH de las reacciones de solubilización y de replegado varía ligeramente con respecto al pH del tampón de solubilización y de replegado, respectivamente. El pH de la reacción de solubilización era un pH de 12,05, en comparación con el del tampón, que era de 12,3.

El pH de la reacción de replegado también se ve afectado por la proteína en disolución. Se midió el pH de la reacción de replegado a 10,3. La dimerización del Fc debería ser eficaz para cualquier pH por encima de 10,0, aunque puede usarse un pH tan bajo como de 9,0, aunque a dicho pH puede producirse la agregación de la proteína.

Ejemplo 12: comparación de la unión al objetivo de la proteína ^{10}Fn3/Fc replegada y expresada en mamífero

Este experimento demuestra que una proteína ^{10}Fn3/Fc que era expresada en *E. coli* y replegada según se describe en el presente documento se une de forma similar a su proteína objetivo con respecto a la misma proteína que era expresada en un cultivo de células de mamífero.

Se expresó una proteína ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc (es decir, una molécula biespecífica que tiene dos entidades ^{10}Fn3 que se unen a dos objetivos diferentes) tanto en *E. coli* y se replegó esencialmente como se describe en los Ejemplos 8 y 9. La misma proteína también se expresó en células de mamífero HEK293-6E. La unión de ambas entidades ^{10}Fn3 a su objetivo fue determinada mediante SPR. Se usó el siguiente formato. Se unió covalentemente la proteína A a un chip. Se capturó la ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc 1,5 nM en la proteína A. La unión de una de las dos proteínas objetivo se midió mediante SPR. Se usó 0,15-5 nM del objetivo.

Los resultados, que se muestran en las Figuras 8A y B, indican que la proteína ^{10}Fn3- ^{10}Fn3-Fc expresada en *E. coli* y replegada tiene una cinética de unión al objetivo similar a la de la proteína ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc que era expresada en células de mamífero. Por lo tanto, las proteínas ^{10}Fn3/Fc expresadas en *E. coli* y replegadas según se describe en el presente documento están al menos lo suficientemente replegadas como para permitir la unión a su objetivo.

Ejemplo 13: comparación de la inhibición de la actividad biológica de la proteína ^{10}Fn3/Fc replegada y expresada en mamífero

Este Ejemplo demuestra que una proteína ^{10}Fn3/Fc que era expresada en *E. coli* y replegada según se describe en el presente documento tenía una actividad biológica similar con respecto a la misma proteína que era expresada en un cultivo de células de mamífero.

En este experimento se inyecta a ratones la ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc biespecífica del Ejemplo 12 elaborada bien en *E. coli* o

bien en células de mamífero, y el nivel de actividad de la molécula de ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc se determinó mediante la determinación del nivel de inhibición de la actividad biológica del objetivo. La proteína de mamífero fue producida en un cultivo en un matraz en agitación de mamífero o en un biorreactor de mamífero. Con fines comparativos, el experimento también incluyó un anticuerpo contra uno de los dos objetivos y una unión de la adnectina únicamente contra uno de los objetivos (es decir, una mono-adnectina). Se probaron diferentes concentraciones de cada una. Se probaron tres actividades biológicas diferentes de la proteína objetivo: dos de las actividades consistían en la secreción inducida de dos citocinas diferentes, y la tercera actividad biológica de la proteína objetivo era la estimulación de la transducción de señales.

La inhibición de la secreción de una citocina se muestra en la Figura 9. Los resultados indican que la proteína ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc expresada en *E. coli* y replegada según se describe en el presente documento inhibe la secreción de citocinas inducida por el objetivo en un nivel similar. Se observó un resultado similar cuando se midió el nivel de inhibición de la secreción de la segunda citocina (Figura 10).

La inhibición de la transducción de señales se muestra en la Figura 11. Los resultados indican que la proteína ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc expresada en *E. coli* y replegada según se describe en el presente documento inhibe la transducción de señales inducida por el objetivo en un nivel similar.

Por lo tanto, estos resultados, tomados junto con los del Ejemplo 12, indican que la proteína ^{10}Fn3-^{10}Fn3-Fc expresada en *E. coli* y replegada según se describe en el presente documento está al menos lo suficientemente replegada como para tener una actividad biológica que es similar a la de la misma proteína expresada en un sistema de cultivo de células de mamífero.

El alcance de la presente invención no está limitado por las realizaciones descritas en el presente documento, que pretenden ser ilustraciones individuales de aspectos individuales de la invención, y cualquieras que sean funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el replegado de una proteína desnaturalizada, que comprende

suspender en una solución en suspensión una proteína desnaturalizada para obtener una composición que comprende proteínas desnaturalizadas suspendidas;
combinar la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas con un tampón de solubilización que tiene un pH en el intervalo de entre 10,5 y 13 para obtener así una composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas; y
combinar la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 9 y 11 para obtener así una composición que comprende proteínas replegadas; en donde el método no incluye el uso de un agente desnaturalizante.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el pH del tampón de solubilización es un pH en el intervalo de entre 11,5 y 12,8, en particular en el intervalo de entre 12,0 y 12,6.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el pH del tampón de replegado es un pH en el intervalo de entre 10 a 10,6, particularmente en el intervalo de entre 10,3 y 10,5.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la solución en suspensión consiste en agua.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada tiene un pH en el intervalo de entre 11 y 13, en particular en el intervalo de entre 11,5 y 12,8, más particularmente en el intervalo de entre 12,0 y 12,6.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición que comprende la proteína replegada tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 11, en particular en el intervalo de entre 10 y 10,6, más particularmente en el intervalo de entre 10,3 y 10,5.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las proteínas desnaturalizadas se suspenden en una solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:1-3, en particular de 1:2.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la solución en suspensión es agua.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que

a) la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas se combina con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30, en particular de 1:20; y/o
b) en el que la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas se combina con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:1-5, en particular de 1:3-4;
y/o
c) en el que las proteínas desnaturalizadas se suspenden en una solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:1-3;
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas se combina con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:10-30; y
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas se combina con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:1-5.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el tampón de solubilización tiene un pH en el intervalo de entre 11,5 y 12,8, y el tampón de replegado tiene un pH en el intervalo de entre 10 y 10,9.

11. El método de la reivindicación 10, en el que
las proteínas desnaturalizadas se suspenden en una solución en suspensión en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:2;
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas se combina con un tampón de solubilización en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:20; y
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas se combina con un tampón de replegado en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:3-4.

12. El método de la reivindicación 11, en el que
las proteínas desnaturalizadas se suspenden en agua en una proporción en peso (g) de proteínas

desnaturalizadas:volumen (ml) de la solución en suspensión de 1:2;
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas suspendidas se combina con un tampón de solubilización que tiene un pH de 12,2 en una proporción en peso (g) de proteínas desnaturalizadas:volumen (ml) de tampón de solubilización de 1:20; y
la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas se combina con un tampón de replegado que tiene un pH en el intervalo de entre 10,2 y 10,6 en una proporción en volumen de tampón de solubilización:volumen de tampón de replegado de 1:3-4.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que las proteínas desnaturalizadas suspendidas y el tampón de solubilización se combinan durante 1-10 minutos, en particular durante 2 - 5 minutos, antes de ser combinadas con el tampón de replegado.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la composición que comprende las proteínas desnaturalizadas solubilizadas se combina con el tampón de replegado durante 5-60 minutos, en particular durante 15-25 minutos.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14,
en donde el método comprende la reducción del pH de la composición que comprende las proteínas replegadas; y/o
en el que el tampón de solubilización comprende arginina; y/o
en el que el tampón de replegado comprende arginina; y/o
en el que el tampón de replegado comprende un agente oxidante, en particular glutatión, más particularmente en el que el glutatión está en una proporción de 5:1 de oxidado:reducido;
y/o
en el que el método no comprende suspender en primer lugar la proteína desnaturalizada en una solución en suspensión; y/o
en el que las proteínas desnaturalizadas están en forma de cuerpos de inclusión (CI); y/o en el que la proteína comprende al menos una cisteína; en particular al menos dos cisteínas que forman un puente de disulfuro en la proteína nativa;
y/o
en el que la proteína comprende una región Fc, en particular una región Fc que comprende una bisagra; y/o
en el que la proteína comprende un dominio de unión que se une específicamente a una proteína objetivo, en particular, en el que el dominio de unión es un dominio de unión de soporte alternativo, más particularmente en el que el dominio de unión de soporte alternativo es un dominio de soporte a base de fibronectina, como un dominio ^{10}FN3; y/o
en el que la proteína comprende una proteína ^{10}FN3 y una región Fc que comprende un dominio de bisagra, de CH2 y de CH3.

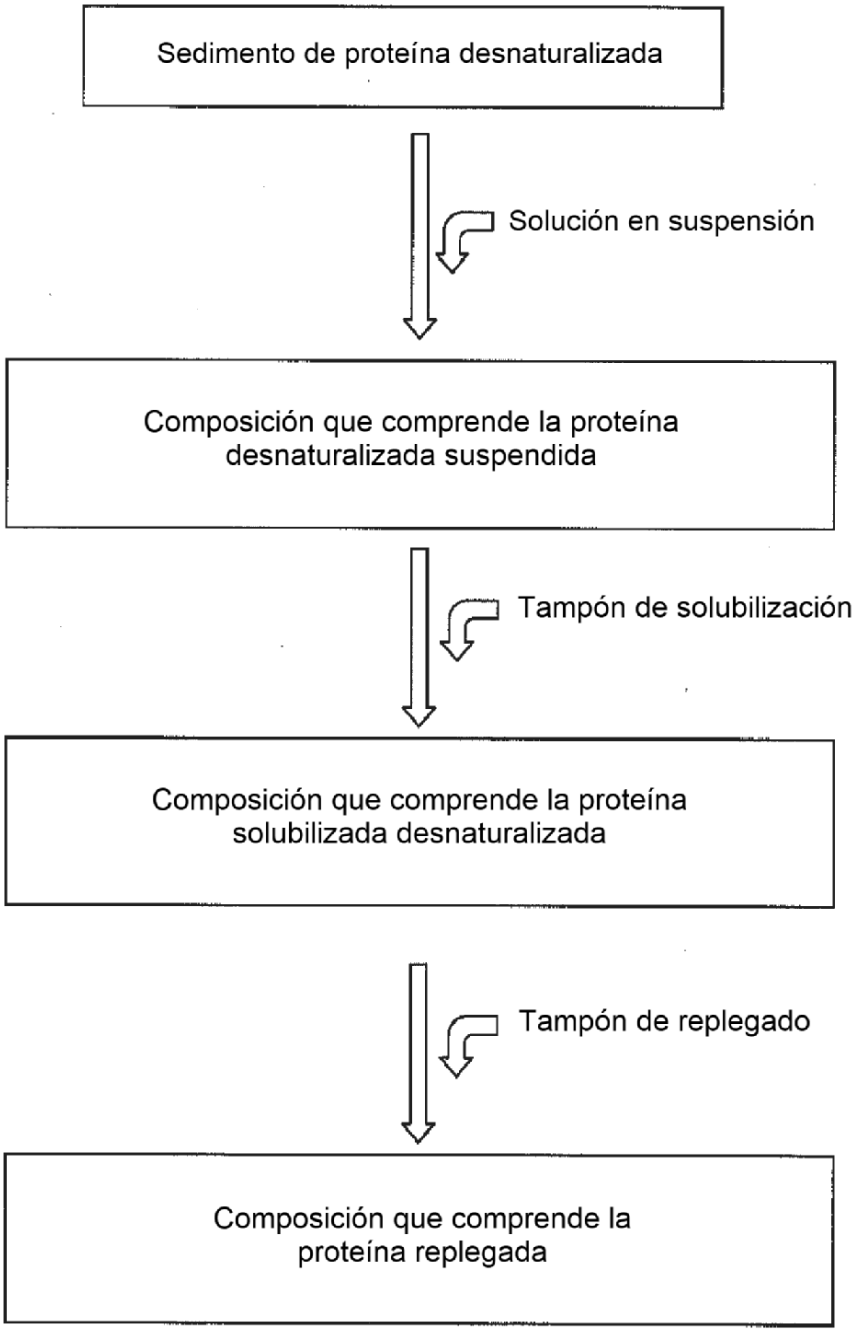

Sedimento de proteína desnaturalizada
Solución en suspensión
Composición que comprende la proteína desnaturalizada suspendida
Tampón de solubilización
Composición que comprende la proteína solubilizada desnaturalizada
Tampón de replegado
Composición que comprende la proteína replegada

FIG. 1

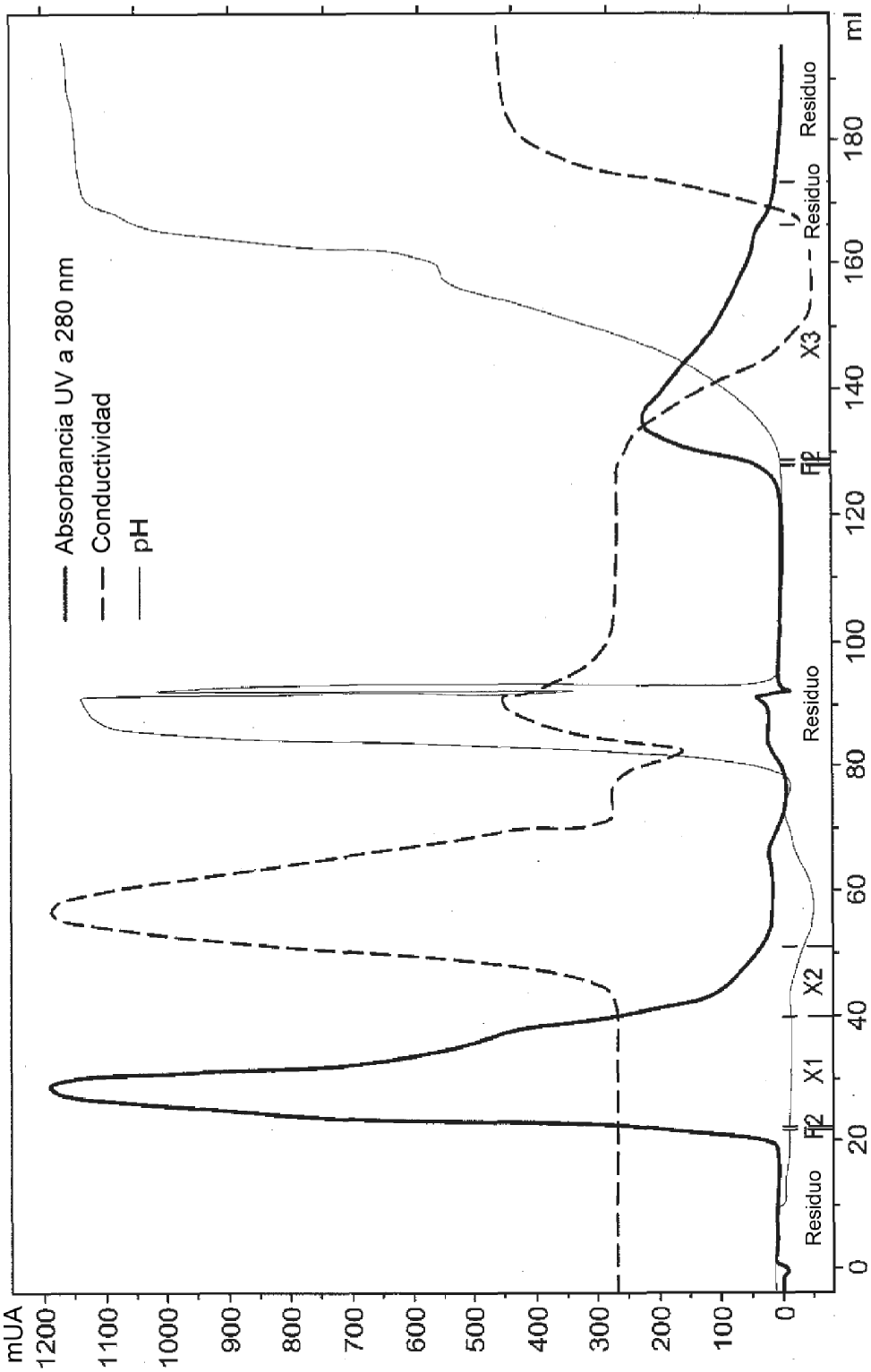

mUA
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Absorbancia UV a 280 nm
Conductividad
pH
Residuo
Fr2
X1
X2
Residuo
Fr1
X3
Residuo
Residuo
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
ml

FIG. 2A

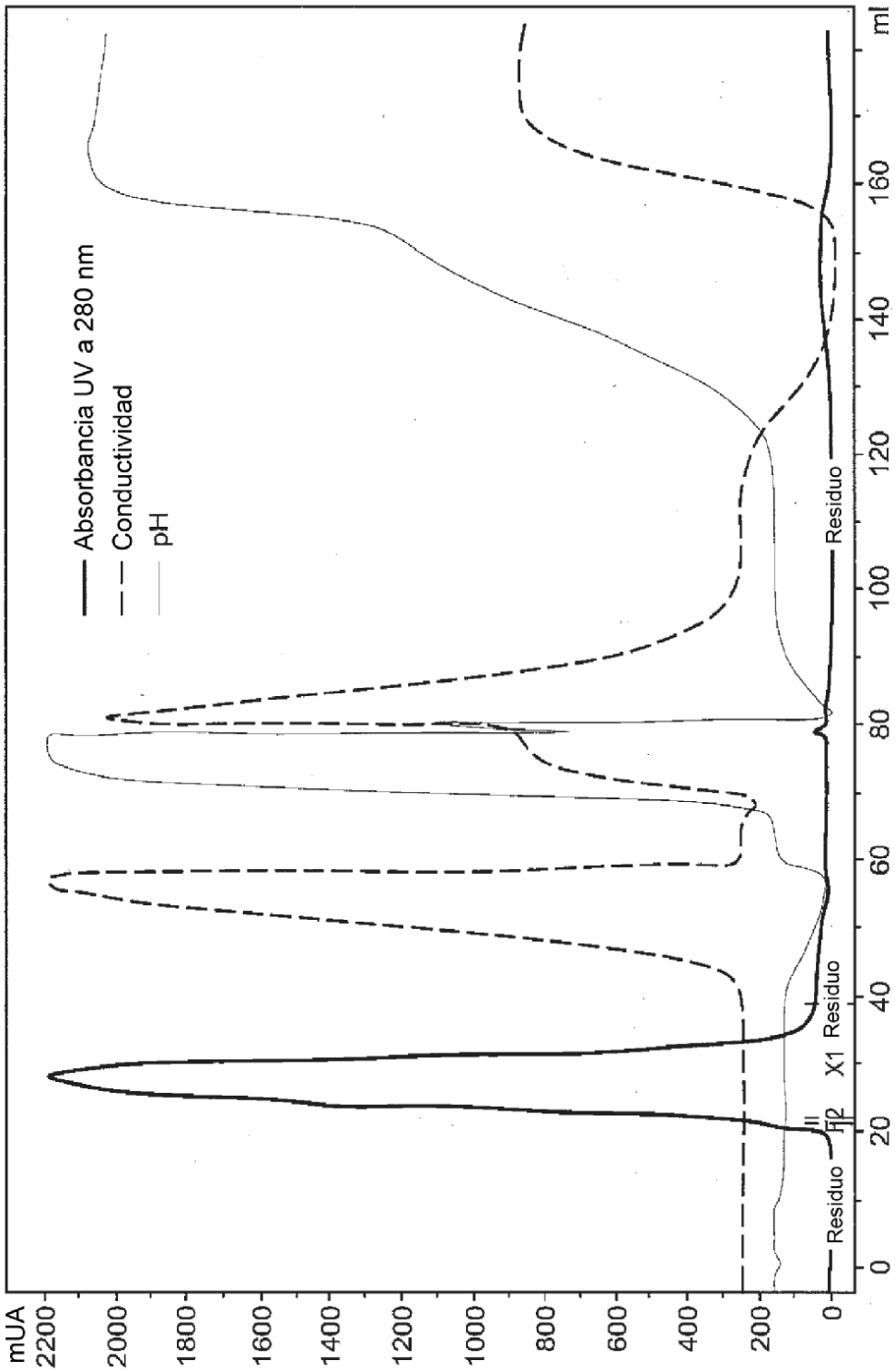

mUA
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Absorbancia UV a 280 nm
Conductividad
pH
Residuo
F2
F1
X1
Residuo
Residuo
0
20
40
60
80
100
120
140
160
ml

FIG. 2B

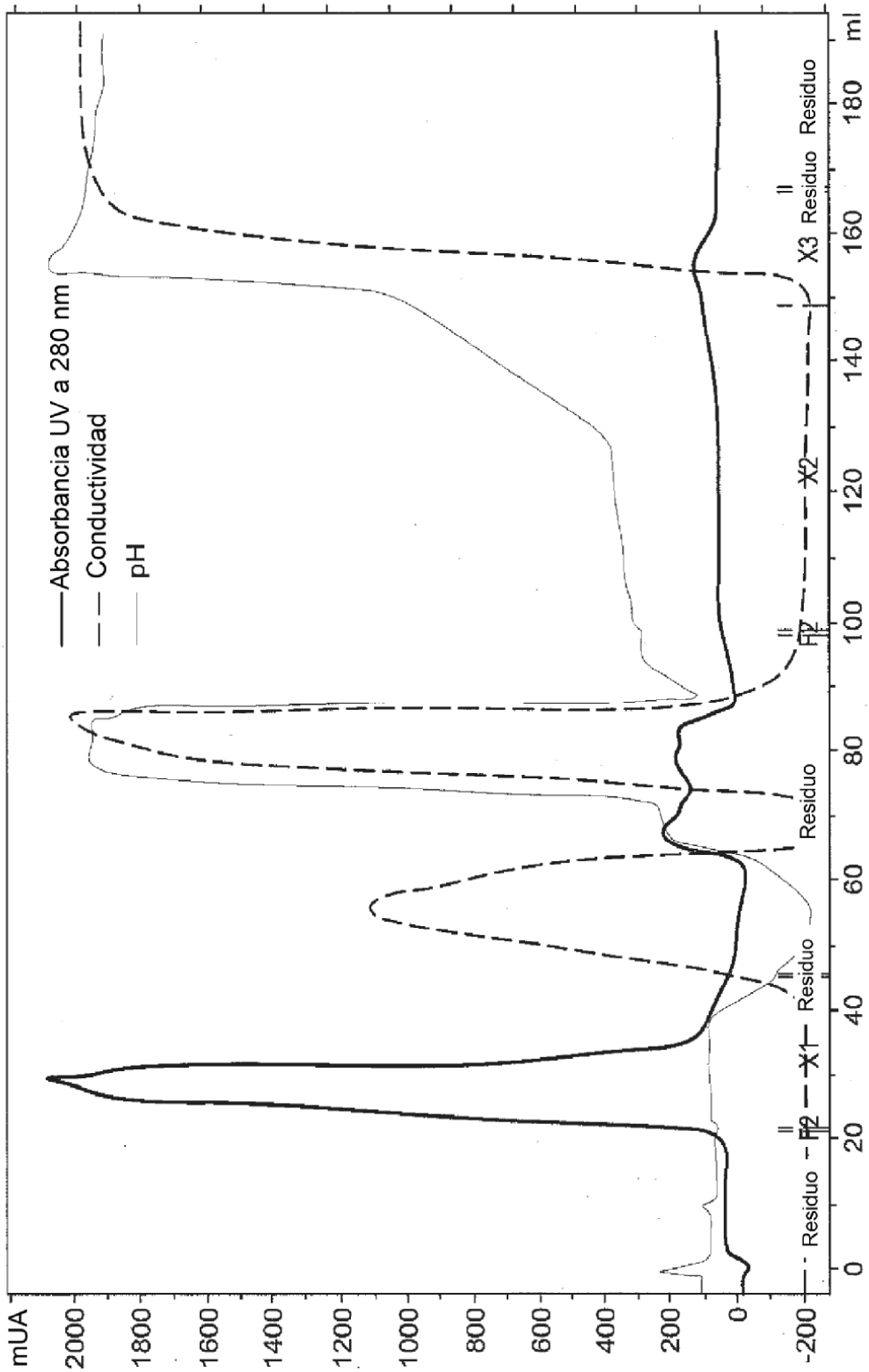

Absorbancia UV a 280 nm
Conductividad
pH
mUA
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
ml
Residuo
F2
X1
Residuo
Residuo
F2
X2
X3
Residuo
Residuo

FIG. 2C

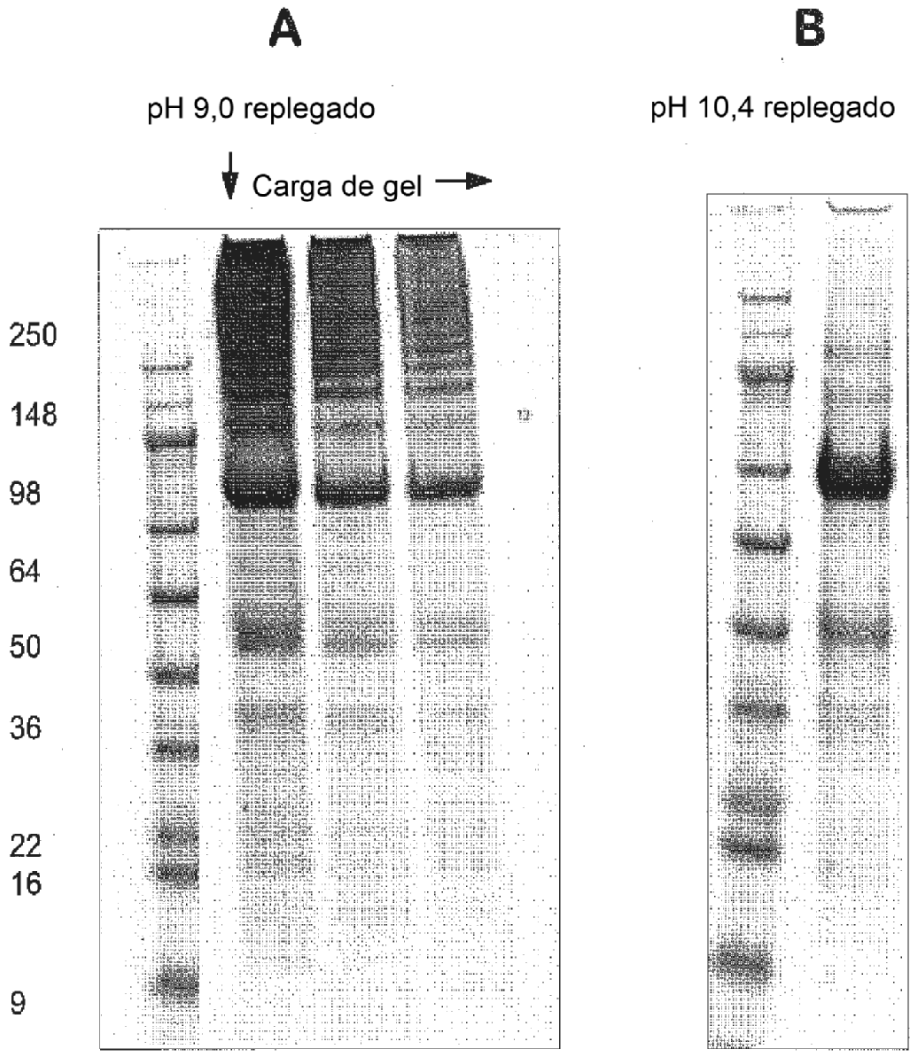

A
B
pH 9,0 replegado
pH 10,4 replegado
Carga de gel
250
148
98
64
50
36
22
16
9

FIG. 3

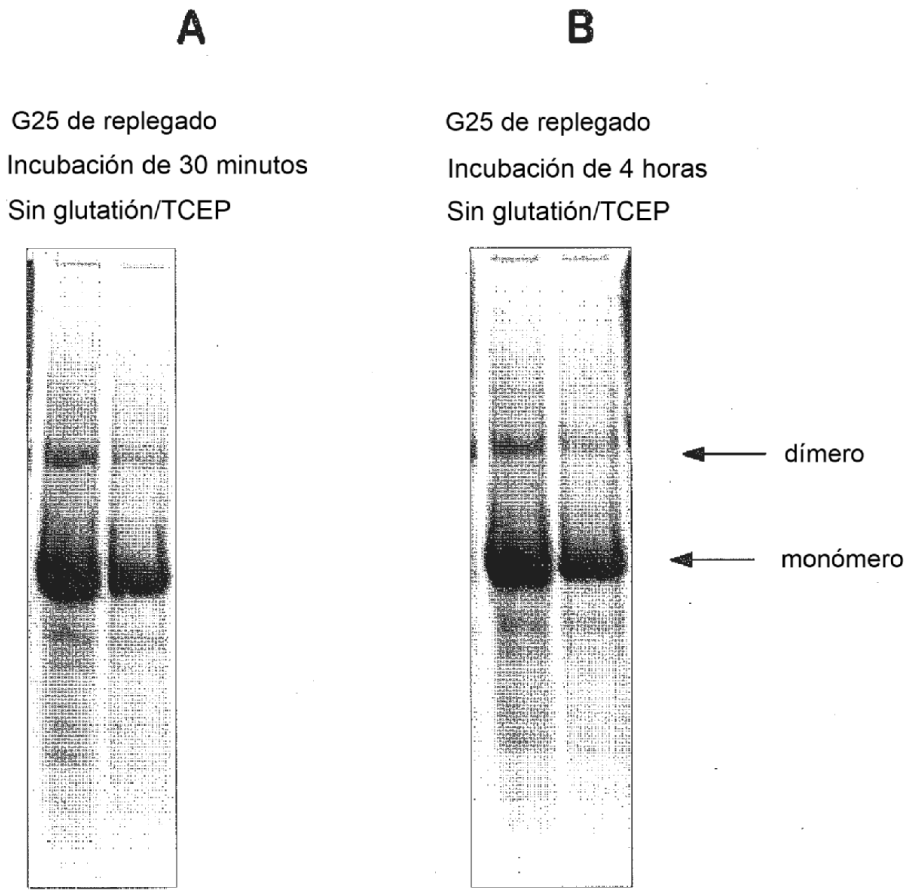

A
B
G25 de replegado
Incubación de 30 minutos
Sin glutatión/TCEP
G25 de replegado
Incubación de 4 horas
Sin glutatión/TCEP
dímero
monómero

FIG. 4

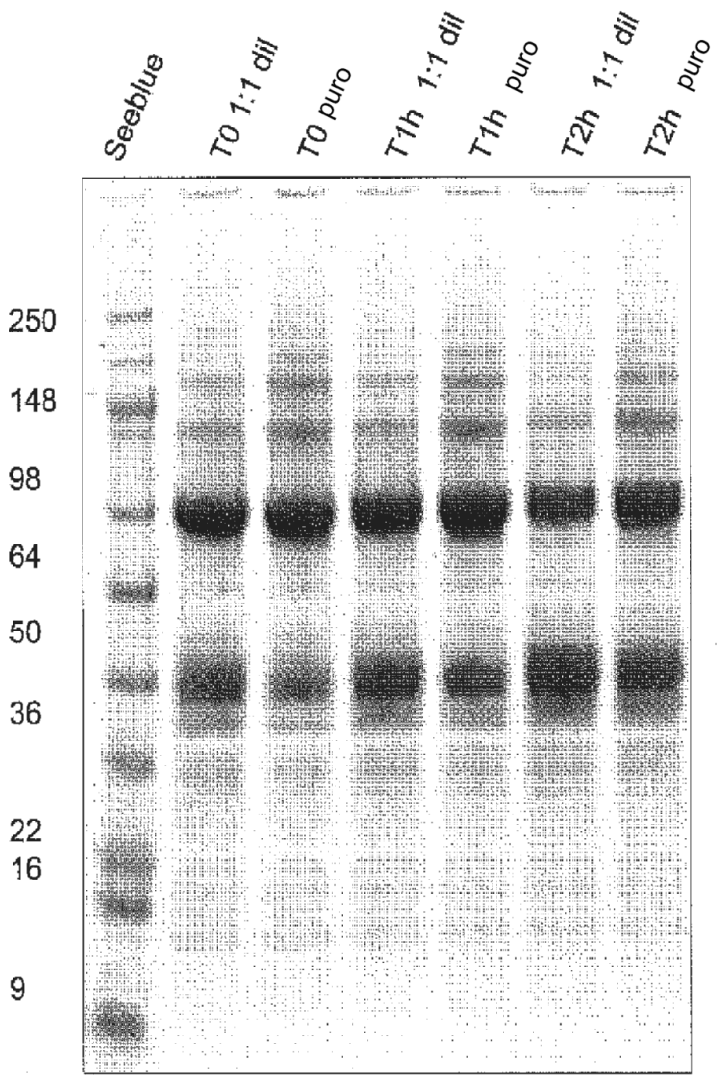

Seeblue
T0 1:1 dil
T0 puro
T1h 1:1 dil
T1h puro
T2h 1:1 dil
T2h puro
250
148
98
64
50
36
22
16
9

FIG. 5

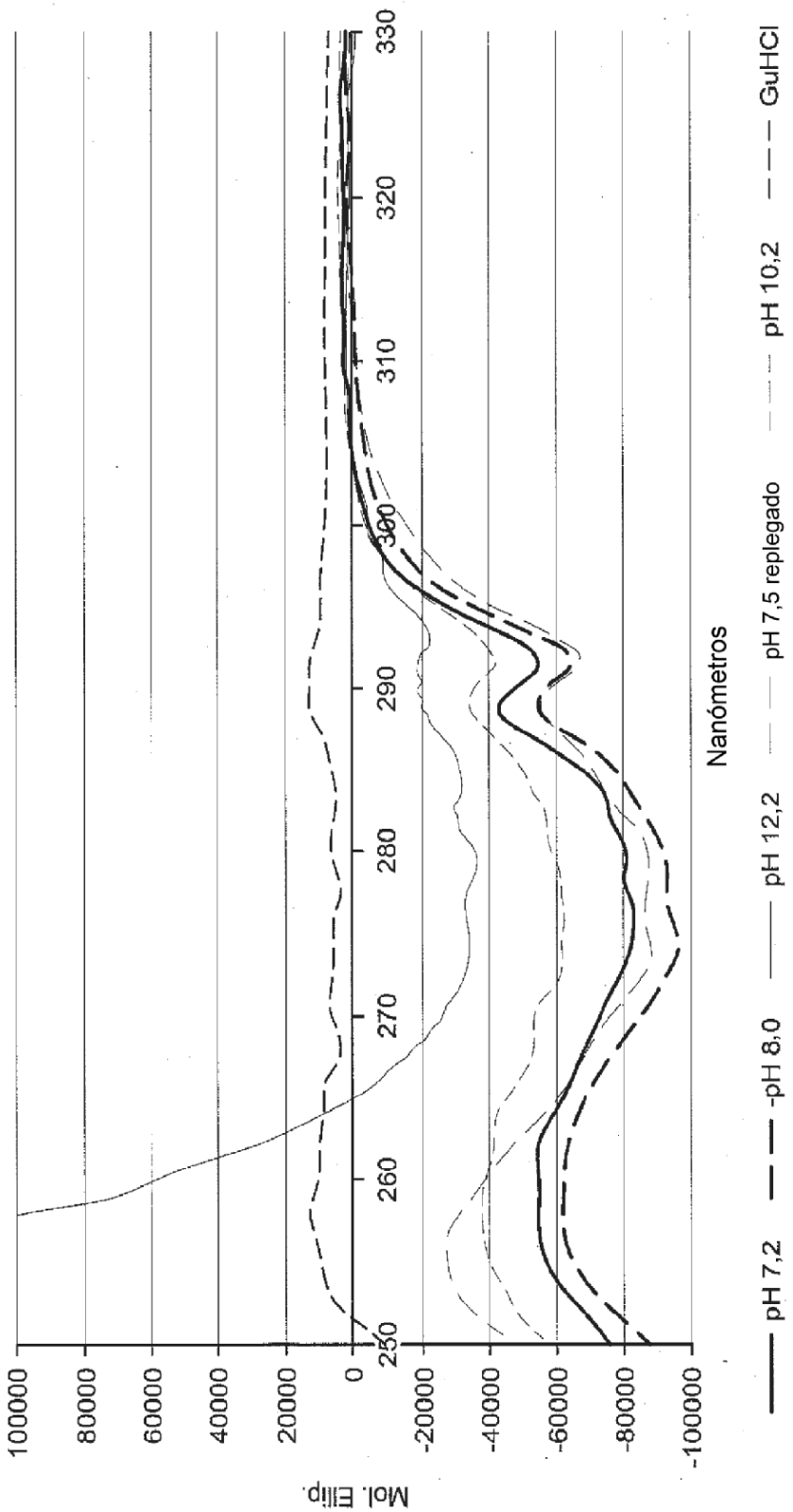

Mol. Elip.
100000
80000
60000
40000
20000
0
-20000
-40000
-60000
-80000
-100000
250
260
270
280
290
300
310
320
330
Nanómetros
pH 7,2
-pH 8,0
pH 12,2
pH 7,5 replegado
pH 10,2
GuHCl

FIG. 6A

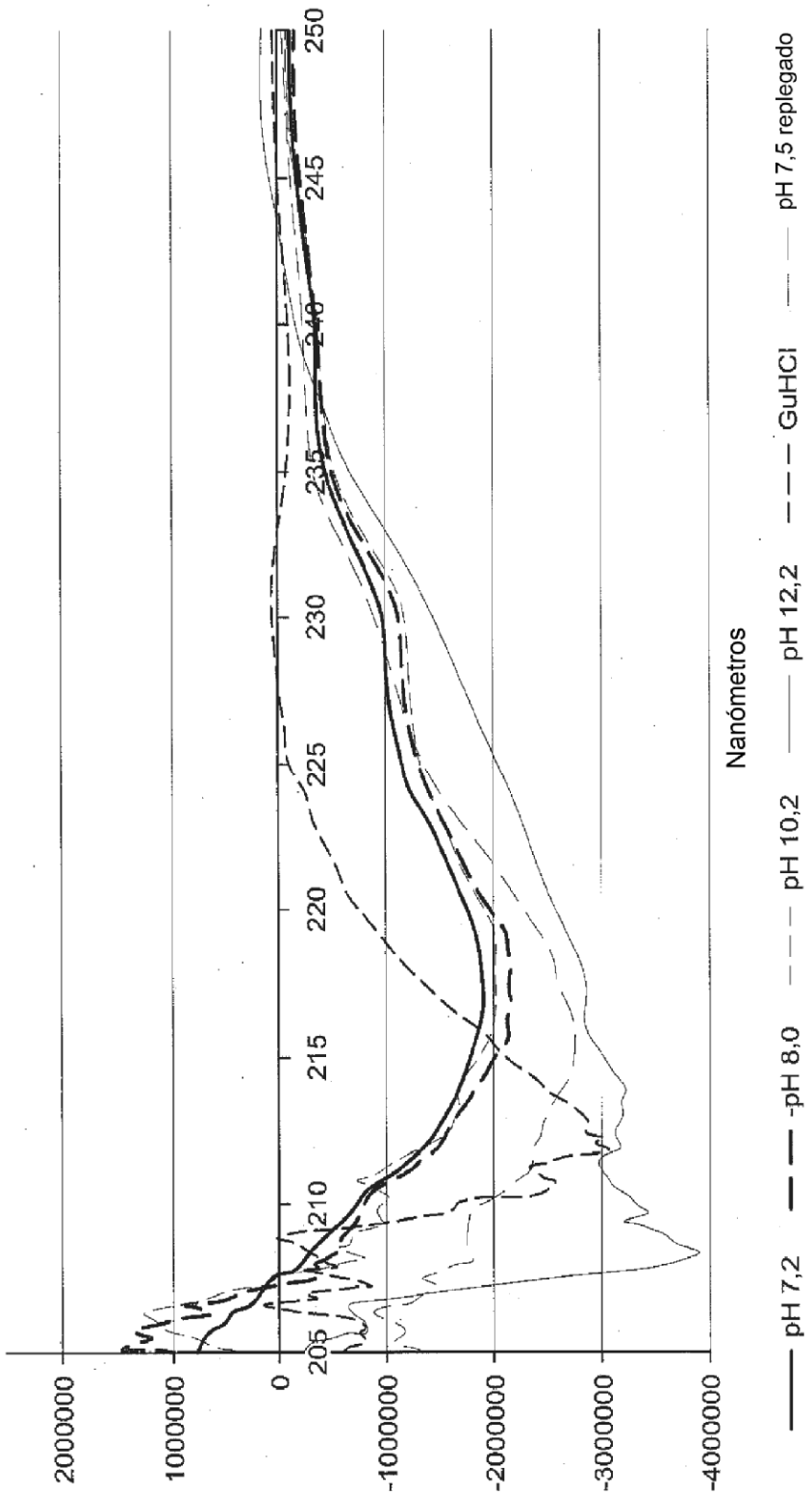

2000000
1000000
0
-1000000
-2000000
-3000000
-4000000
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
Nanómetros
pH 7,2
-pH 8,0
pH 10,2
pH 12,2
GuHCl
pH 7,5 replegado

FIG. 6B

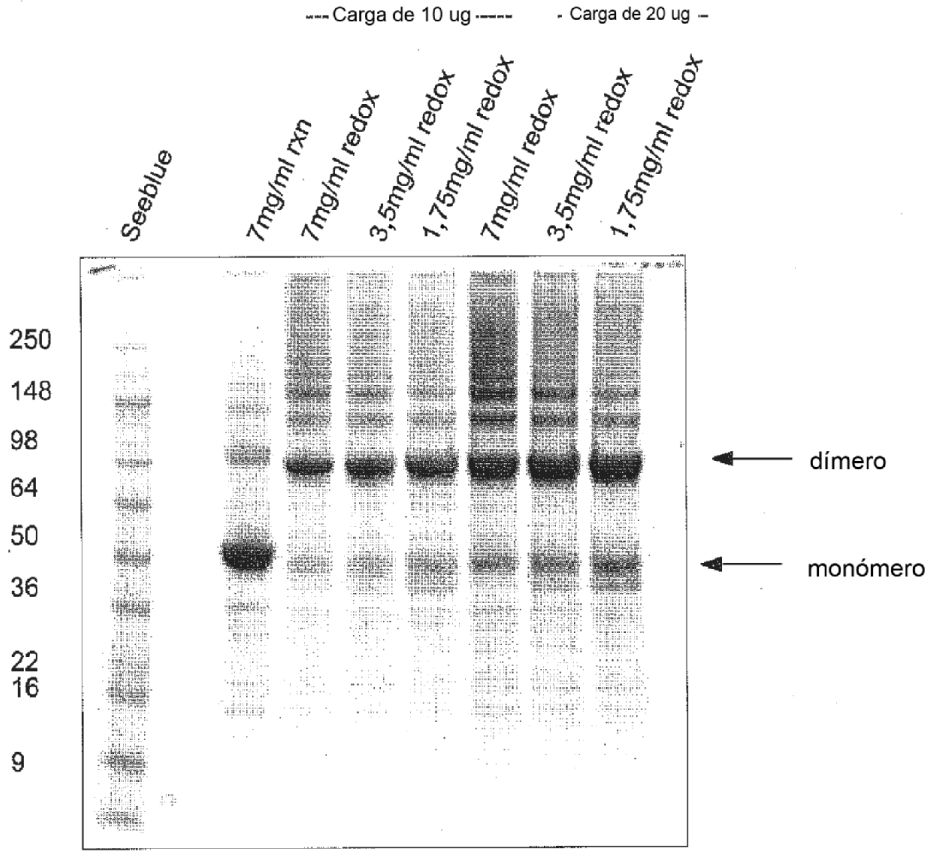
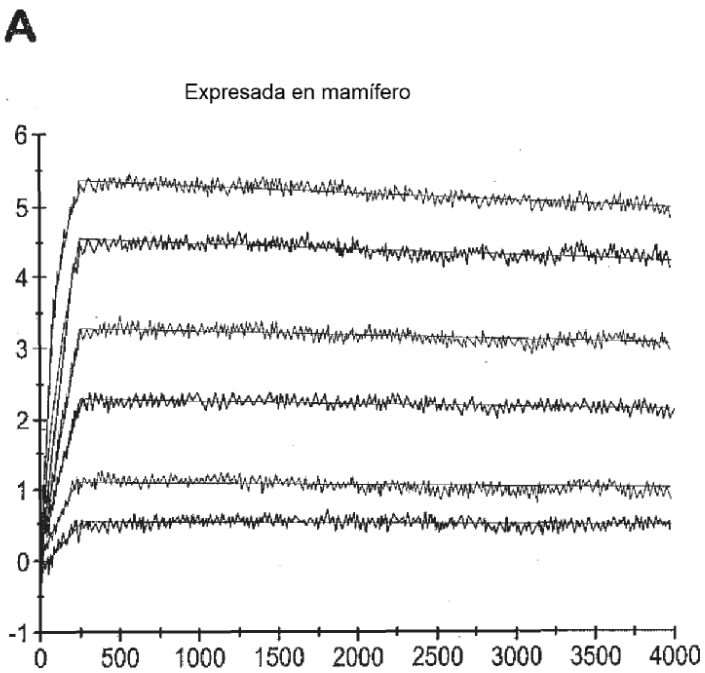
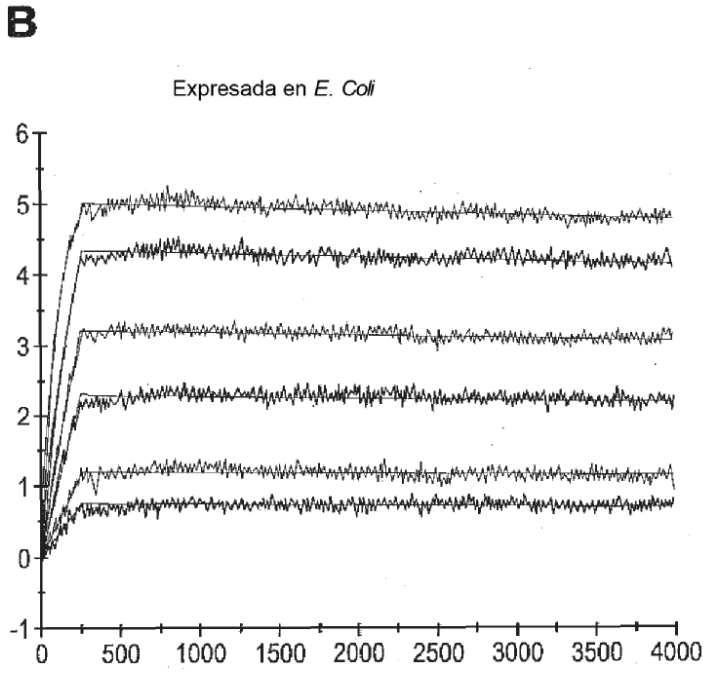

Carga de 10 ug
Carga de 20 ug
Seeblue
7mg/ml rxn
7mg/ml redox
3,5mg/ml redox
1,75mg/ml redox
7mg/ml redox
3,5mg/ml redox
1,75mg/ml redox
250
148
98
64
50
36
22
16
9
dímero
monómero

FIG. 7



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi ^{2} (RU ^{2})
2,41E+06	1,94E-05	8,04E-12	0,00366



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi ^{2} (RU ^{2})
2,44E+06	1,30E-05	5,31E-12	0,00408

FIG. 8

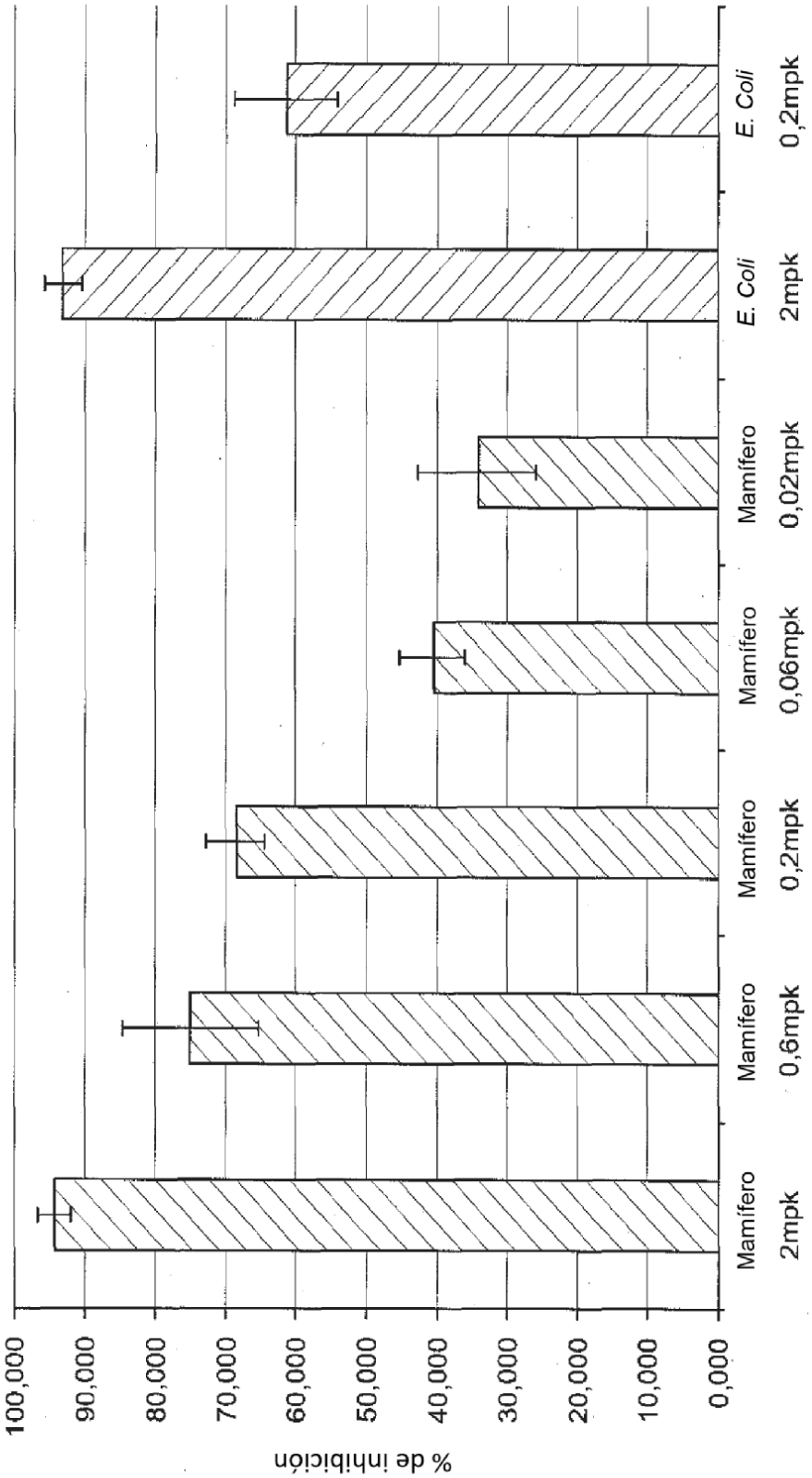
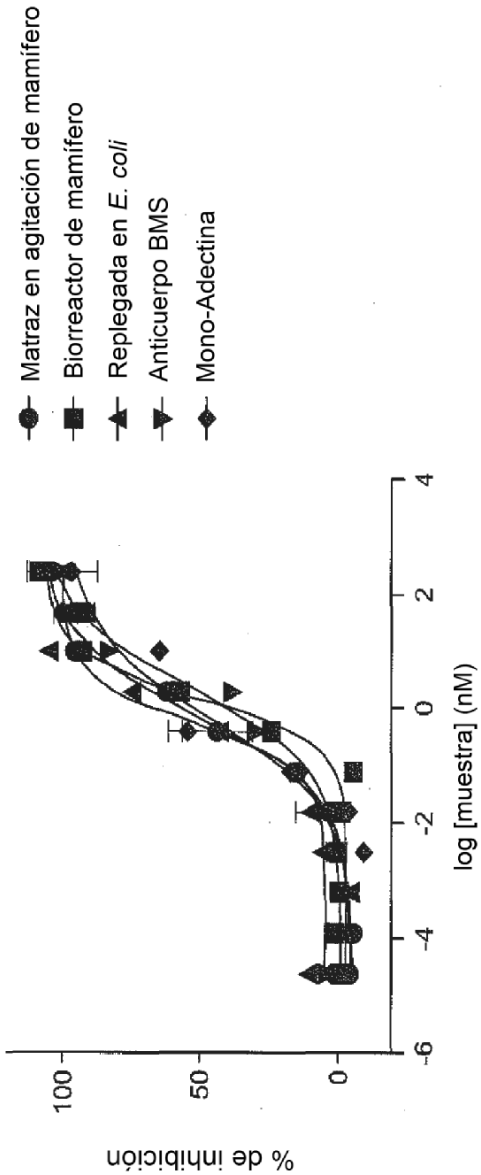
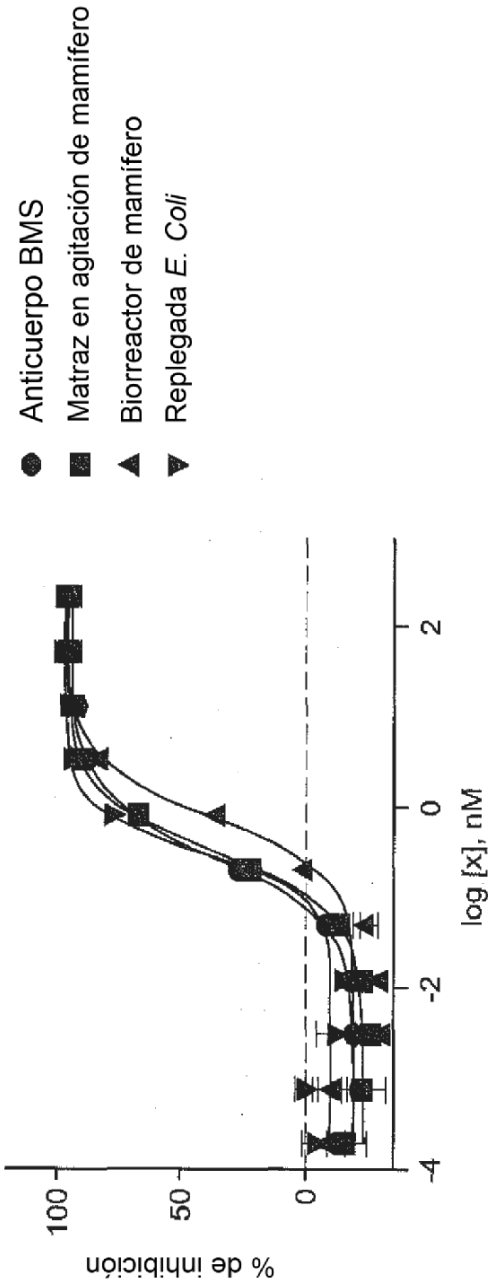

% de inhibición
100,000
90,000
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0,000
Mamífero 2mpk
Mamífero 0,6mpk
Mamífero 0,2mpk
Mamífero 0,06mpk
Mamífero 0,02mpk
E. Coli 2mpk
E. Coli 0,2mpk

FIG. 9



	CI50
Anticuerpo BMS	2,154
Matraz en agitación de mamífero	0,7492
Biorreactor de mamífero	1,45
Replegada de *E. Coli*	0,515
Mono-Adectina	0,6122

FIG. 10



	CI50
Anticuerpo BMS	0,2763
Matraz en agitación de mamífero	0,3004
Biorreactor de mamífero	0,7337
Replegada *E. Coli*	0,3150

FIG. 11