

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 997**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G16C 20/30 (2009.01)

G16C 20/40 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2017 PCT/GB2017/050743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17158371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2017 E 17713395 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3430382**

54 Título: **Análisis estructural de proteínas basado en espectroscopia de desplazamiento de excitación de borde al rojo (REES)**

30 Prioridad:

18.03.2016 GB 201604640

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

25.11.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF BATH (100.0%)
Wessex House 3-8 Claverton Down
Bath, Bath and North East Somerset BA2 7AY,
GB**

72 Inventor/es:

PUDNEY, CHRISTOPHER ROLAND

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 795 997 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

Análisis estructural de proteínas basado en espectroscopia de desplazamiento de excitación de borde al rojo (REES)

Campo de la invención

5 Aspectos y realizaciones se refieren a un método, un producto de programa informático y una unidad de análisis estructural de proteínas configurada para realizar el método. Otros aspectos y realizaciones proporcionan un aparato de análisis estructural de proteínas que incluye un producto de programa informático o unidad de análisis estructural de proteínas configurada para realizar el método y sus usos.

Antecedentes

10 Las proteínas son polipéptidos formados por secuencias de aminoácidos monómeros. La estructura de la proteína determina la función de la proteína. Las proteínas se pueden plegar en una o más conformaciones espaciales específicas dirigidas por diversas interacciones no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y empaquetamiento hidrófobo. Se puede ayudar a comprender la funcionalidad de una proteína a nivel molecular si se puede determinar su estructura tridimensional.

15 Se entenderá que las proteínas son moléculas termodinámicamente inestables y se puede considerar que son moléculas dinámicas, intrínsecamente flexibles, y una muestra puede tener una variedad de estados conformacionales. Por ejemplo, los estados plegados y desplegados de una proteína pueden diferir solo en la energía de un pequeño número de enlaces de hidrógeno.

20 A menudo, la plasticidad conformacional de una proteína es una característica importante de la unión del ligando y la actividad enzimática. Al igual que la estructura plegada de una proteína, la flexibilidad de la proteína también puede ser termodinámicamente inestable. Es decir, pequeños cambios en el entorno molecular o las interacciones de la proteína pueden alterar significativamente la flexibilidad normal de una proteína.

Algunas proteínas, tales como los anticuerpos, se basan en un perfil dinámico natural con el fin de funcionar correctamente. La labilidad de la dinámica de las proteínas puede ser una barrera importante para la investigación, fabricación y almacenamiento de dichas proteínas.

25 Los desafíos de desarrollar formulaciones de biomoléculas estables y analizar la retención precisa de la conformación son cruciales para la viabilidad comercial y la eficacia de los productos biofarmacéuticos. Sin embargo, todavía no están en marcha las técnicas para capturar cambios sutiles o incluso importantes en el perfil dinámico natural de una proteína. Los planteamientos potenciales que capturan esta información incluyen RMN, EPR, espectroscopía de molécula única, espectrometría de masas de movilidad iónica (IM-MS) y espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D). Sin embargo, estos planteamientos no se usan de manera rutinaria debido a la significativa complejidad técnica y viabilidad, coste de instrumentos, tiempo de análisis, preparación de muestras compleja y la necesidad de análisis especializados.

30 Chaudhuri A et al.: "Organization and dynamics of tryptophans in the molten globule state of bovine alpha-lactalbumin utilizing wavelength-selective fluorescence approach: Comparisons with native and denatured states", *Biochemical And Biophysical Research Communications*, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 394, nº 4, 24 de marzo de 2010 (2010-03-04) describen un conjunto de estrategias basadas en el efecto de borde al rojo en la espectroscopía de fluorescencia que se puede usar para vigilar directamente el entorno y la dinámica alrededor de un fluoróforo en un sistema complejo. El documento establece que REES surge debido a velocidades lentas de relajación del disolvente (reorientación) alrededor de un fluoróforo en estado excitado, lo cual depende de la restricción de movimiento impuesta a las moléculas de disolvente en la proximidad inmediata del fluoróforo. Usando esta estrategia, se hace posible detectar los parámetros de movilidad del entorno usando un fluoróforo como grupo informador. El documento describe los espectros de emisión de fluorescencia de α -lactoalbúmina bovina en varias conformaciones y se muestra que un desplazamiento del máximo de emisión en la excitación de borde al rojo está relacionado con la conformación de la proteína.

45 Klajnert B et al.: "Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, Elsevier, Netherlands, vol. 1648, nº. 1-2, 2003, páginas 115-126, estudia las interacciones entre los dendrímeros PAMAM y la albúmina de suero bovino (BSA). El documento describe el uso de albúmina de suero bovino (que contiene dos restos de triptófano) para evaluar la influencia de los dendrímeros en la conformación molecular de la proteína. En particular, el documento describe la medición de cambios en la fluorescencia de BSA en presencia de dendrímeros. REES se usó para analizar si los restos de triptófano (en una interacción PAMAM-BSA dada) se encontraban en un entorno con restricción de movimiento.

50 H. Raghuraman y Chattopadhyay A: "Effect of ionic strength on folding and aggregation of the haemolytic peptide melittin in solution", *Biopolymers*, vol. 83, nº 2, 5 de mayo de 2006 (2006-05-05), páginas 111-121 describe un estudio del efecto de la fuerza iónica en el plegamiento y la agregación del péptido hemolítico melitina en solución. El estudio muestra que se puede usar REES como una herramienta para vigilar el comportamiento de agregación de la melitina en particular y otras proteínas y péptidos en general. El documento incluye resultados que muestran el efecto del

cambio de la longitud de onda de excitación sobre la longitud de onda de emisión máxima de la melitina en soluciones acuosas de varias concentraciones. Se observó un cambio significativo en la magnitud de REES tras aumentar la concentración de NaCl de 0.1 a 1 M. El documento atribuye el cambio a un aumento en la restricción de movimiento de las moléculas de disolvente alrededor de los restos de triptófano en estado excitado con una fuerza iónica creciente.

5 El documento sugiere que el efecto en REES observado sugiere que la autoasociación de melitina inducida por la sal está acoplada con el cambio en la dinámica de hidratación alrededor del resto de triptófano.

Se desea proporcionar un mecanismo para proporcionar información sobre la estructura conformacional de una proteína.

Resumen

10 Por consiguiente, un primer aspecto proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

Aspectos y realizaciones reconocen que las proteínas en general y las proteínas biofarmacéuticas en particular pueden tener una amplia variedad de aplicaciones comerciales, académicas y terapéuticas y que su función adecuada a menudo se basa en la estructura de la proteína. En particular, la función de la proteína puede depender de la flexibilidad de la proteína, por ejemplo, para el reconocimiento de epítomos por anticuerpos.

15 La anomalía en la flexibilidad normal de las proteínas es común, por ejemplo, bajo cambios pequeños de temperatura. De manera similar, cuando se fabrica, una proteína puede mostrar variaciones en la flexibilidad de un lote a otro, ya que la flexibilidad puede ser el aspecto menos "estable" de la estructura de la proteína. La pérdida de flexibilidad natural puede continuar con el desplegado y la agregación. A escala industrial, la variación o pérdida de la función de la proteína como resultado de cambios en la estructura de la proteína representa una gran pérdida en los potenciales ingresos y los costes de investigación.

20

Las herramientas de control de calidad analítico (QC) requeridas en relación con productos biofarmacéuticos y otros productos biológicos en los que la estructura determina la función difieren significativamente de las requeridas en relación con, por ejemplo, productos farmacéuticos puramente químicos. Los requisitos mínimos de ensayo para productos biofarmacéuticos pueden incluir, por ejemplo: estabilidad fisicoquímica y evaluación de la degradación y partículas subvisibles (agregados solubles).

25

Aspectos y realizaciones reconocen que una herramienta analítica que pueda ofrecer un medio para detectar cuándo las proteínas, por ejemplo, productos biofarmacéuticos, pueden haber perdido su conformación y/o flexibilidad normales y/o empezado a agregarse, puede tener beneficios significativos. Dicha herramienta analítica se puede usar dentro de los procedimientos de fabricación industrial en relación con, por ejemplo, el QC de proteínas, tal como los

30 lotes de anticuerpos, y por los formuladores con el fin de determinar los disolventes e iones tampón adecuados y similares en los que almacenar proteínas, creando así una muestra de proteína estable. Además, los usuarios finales pueden usar una herramienta analítica adecuada provista de aspectos y realizaciones para verificar, por ejemplo, que las proteínas compradas en el mercado, incluyendo los anticuerpos, todavía son adecuadas para su propósito.

Algunas herramientas de análisis de proteínas pueden llevar mucho tiempo, requieren conocimientos especializados, instrumentación costosa y pueden ser muy específicas del sistema. Aspectos y realizaciones pueden proporcionar una técnica analítica simple y robusta que se puede usar sin necesidad de equipos altamente especializados, en una amplia variedad de proteínas y en una variedad de entornos.

35

Aspectos reconocen que puede ser posible usar un fenómeno óptico para analizar la estructura de la proteína, y que observando las características del fenómeno óptico presentadas por una muestra de proteína que comprende una proteína, disolvente y tampón, se puede determinar una huella o caracterización de esa muestra de proteína. Aspectos y realizaciones reconocen que las características del fenómeno óptico presentado por una muestra de proteína que comprende una proteína, disolvente y tampón trazan un mapa de características particulares de la estructura de la proteína. Los aspectos y realizaciones pueden proporcionar un mecanismo para caracterizar una estructura de muestra de proteína numéricamente, proporcionando cada característica numérica una indicación de una característica física de la estructura de una proteína dentro de una muestra de proteína. Además, dicho análisis numérico puede permitir la comparación de una muestra de proteína con una muestra de proteína "ideal" (por ejemplo, un control), proporcionando así un medio para evaluar los cambios en la estructura de una proteína dentro de una muestra de proteína. Los cambios detectados en la estructura pueden ofrecer una indicación del grado en que la proteína en la muestra de proteína puede proporcionar la función de proteína deseada.

40

45

Aspectos y realizaciones reconocen que algunas muestras de proteínas pueden, por excitación con radiación adecuada, emitir radiación y esa emisión puede comprender un espectro de emisión de fluorescencia. Aspectos y realizaciones reconocen que, si una muestra de proteína emite un espectro de fluorescencia en el caso de una estimulación adecuada, los "desplazamientos de borde" en los espectros de fluorescencia obtenidos de muestras de proteína pueden contener información con respecto a la estructura de la proteína. Los aspectos reconocen que el uso de los fenómenos de fluorescencia para analizar la estructura de una muestra de proteína puede permitir un análisis de proteínas que es extremadamente rápido, de bajo coste, fácil de realizar y rico en información. Además, dichas técnicas pueden ser no destructivas para la muestra de proteína que se analiza.

50

55

Por ejemplo, algunos aspectos y realizaciones pueden usar un fenómeno óptico llamado desplazamiento de excitación de borde al rojo (REES). El efecto de REES se produce como resultado de la fluorescencia de las moléculas y puede proporcionar un mecanismo para comprender tanto la estructura inherente de la muestra de proteína como la forma en que las proteínas pueden interactuar con su entorno circundante. Aspectos y realizaciones reconocen que se pueden usar efectos de fluorescencia presentados por proteínas, tales como el efecto de REES, para informar con precisión sobre las características generales de una estructura de proteína y detectar cambios en la flexibilidad de la proteína si se compara entre lotes de una proteína o se comparan muestras de proteínas envejecidas con una muestra de proteína reciente.

Algunos aspectos y realizaciones reconocen que la emisión que procede de, por ejemplo, un solo resto de Trp puede dar un efecto de REES significativo en una proteína cuando está en estados plegados y como glóbulos fundidos, pero que el efecto de REES puede desaparecer o reducirse bastante en estados desplegados. Algunos aspectos y realizaciones reconocen que los efectos de desplazamiento de borde, como el efecto de REES, pueden ofrecer un mecanismo para detectar proteínas con un alto grado de flexibilidad molecular que da como resultado un conjunto de entornos de disolventes alrededor, por ejemplo, de una sonda de Trp. En relación con las proteínas, dicho conjunto puede proceder de un amplio equilibrio de estados conformacionales, tal como en los glóbulos fundidos intermedios de proteínas altamente flexibles o dinámicas.

El análisis típico de los efectos de desplazamiento de borde de fluorescencia presentados por una proteína es tal que se supone que la relación sigue una relación lineal simple entre la excitación aplicada y los espectros de emisión de fluorescencia resultantes. Por ejemplo, a menudo se ajusta una ecuación lineal simple a los datos de REES obtenidos experimentalmente. Aspectos y realizaciones reconocen que dicho ajuste lineal es malo. Aspectos y realizaciones reconocen que la curvatura en una gráfica de datos experimentales se puede explicar por los fenómenos físicos subyacentes y la estructura de la proteína dentro de la muestra de proteína estudiada.

Algunos aspectos y realizaciones cuantifican el efecto de REES ajustando los datos de REES a una función de distribución que captura la curvatura innata en los datos de REES. A partir de la función de distribución ajustada se pueden extraer valores para, por ejemplo, la magnitud relativa del efecto de REES (A_{rel}) y el centro de masas espectral (CSM_0); y aspectos y realizaciones reconocen que esos valores pueden estar relacionados con características estructurales inherentes de la muestra de proteína que se está analizando. Además, aspectos y realizaciones reconocen que los valores extraídos también pueden ser independientes de la longitud de onda de excitación y, por lo tanto, ofrecen un medio para caracterizar u obtener la "huella" de una muestra de proteína.

Por consiguiente, un primer aspecto puede proporcionar un método que comprende: recibir un espectro de emisión de fluorescencia generado por una muestra de proteína a una primera longitud de onda de excitación, estando configurada la muestra de proteína para presentar fluorescencia de forma dependiente de su estado conformacional. Se apreciará que no todas las muestras de proteínas pueden presentar efectos de fluorescencia de desplazamiento de borde. Por consiguiente, el primer aspecto puede proporcionar información en relación con proteínas que presentan fluorescencia intrínseca como resultado de fluoróforos que se encuentran de forma natural dentro de la estructura de la proteína, o que se han configurado adecuadamente con fluoróforos extrínsecos en sitios adecuados dentro de la estructura de la proteína. Con el fin de obtener espectros de fluorescencia útiles, se apreciará que puede ser necesario estimular o excitar una muestra de proteína usando luz u otra radiación que tenga un intervalo de energía (longitud de onda) adecuadamente seleccionado. En particular, las longitudes de onda de excitación se pueden elegir teniendo en cuenta una respuesta de fluorescencia esperada de una muestra de proteína dada.

El método puede comprender: evaluar, a partir del espectro de emisión de fluorescencia, una indicación característica de una respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína a la primera longitud de onda de excitación. La indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína puede comprender una indicación de la longitud de onda a la que se produce el máximo de emisión, o el centro de masas espectral del espectro de emisión.

El método puede comprender: repetir las etapas de recepción y evaluación en relación con una pluralidad de espectros de emisión de fluorescencia, cada espectro de fluorescencia generado por la muestra de proteína a una longitud de onda de excitación diferente a la primera longitud de onda de excitación.

Por consiguiente, una muestra de proteína, ya sea la misma muestra de proteína o varias muestras de proteína tomadas de la misma fuente, se puede volver a analizar, y se puede usar una serie de espectros de emisión relacionados con la misma muestra de proteína para evaluar una indicación representativa de una característica física de la muestra de proteína que se analiza. Se apreciará que el estado conformacional de la muestra de proteína que se analiza debe permanecer estable en toda la serie de espectros de emisión generados. Por consiguiente, se pueden controlar la temperatura y la presión de la muestra de proteína. De manera similar, se puede controlar la intensidad de la radiación que produce la excitación a la primera longitud de onda de excitación y/o las longitudes de onda de radiaciones subsiguientes, para minimizar la probabilidad de que ocurra un cambio conformacional como resultado del análisis o como resultado de un cambio en el entorno ambiental que rodea la muestra de proteína.

El método puede comprender: generar una relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína. Habiendo obtenido una pluralidad de espectros de emisión de fluorescencia de una muestra de proteína, puede ser posible generar una relación entre el

comportamiento macroscópico observado del sistema de muestra de proteína y el probable estado conformacional de la proteína con esa muestra de proteína.

La relación no lineal generada puede comprender una indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína, basada en la correlación de las longitudes de onda de excitación recibidas y las indicaciones evaluadas asociadas características de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína.

Aspectos y realizaciones proporcionan un método basado en fluorescencia que puede proporcionar una "huella" que refleja el perfil dinámico y la estructura de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo. La huella puede comprender, por ejemplo, una caracterización bidimensional. Aspectos y realizaciones pueden proporcionar un medio para discernir entre tipos o clases individuales de proteínas y/o un medio para discernir entre proteínas dentro de un solo tipo o clase. Aspectos y realizaciones pueden proporcionar un medio para discernir entre proteínas con uno o más plegamientos diferentes, entre proteínas en la misma o diferente superfamilia, entre proteínas en la misma o diferentes familias, entre proteínas con diferentes dominios de proteínas, o entre diferentes especies de proteínas.

Aspectos y realizaciones pueden proporcionar un medio para discernir entre proteínas con un nivel alto de similitud de secuencia. Como se describe en la presente memoria y como se ilustra en la Figura 12(c), la presente descripción es eficaz para discernir entre proteínas que tienen un alto grado de similitud de secuencia. Algunos aspectos y realizaciones proporcionan una huella generada en relación con una muestra de proteína para comparar con una huella generada en relación con una proteína con un alto nivel de similitud de secuencia. Dichas proteínas pueden tener al menos 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% de similitud de secuencia. Dichas proteínas pueden tener al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% de similitud de secuencia. Dichas proteínas pueden tener al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% de similitud de secuencia.

Los términos "homología, identidad o similitud" se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico que codifican los dos polipéptidos cuando se comparan por alineamiento de secuencias. El grado de homología entre dos secuencias discretas de ácido nucleico que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes, en posiciones comparables. El porcentaje de identidad se puede determinar por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar comparando la información de la secuencia usando un programa informático tal como: ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar valores diferentes dependiendo de: (i) el método usado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas), o la alineación estructural de la comparación 3D; y (ii) los parámetros usados por el método de alineación, por ejemplo, la alineación local frente a la global, la matriz de puntuación de parejas usada (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.) y la penalización por hueco, por ejemplo, la forma funcional y constantes. Una vez realizado el alineamiento, existen diferentes formas de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, se puede dividir el número de identidades entre: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de alineamiento; (iii) la longitud media de secuencia; (iv) el número de posiciones sin hueco; o (v) el número de posiciones equivalentes excluyendo segmentos protuberantes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende en gran medida de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto es un par de secuencias, mayor es la identidad de secuencia que se puede esperar que ocurra por casualidad. El popular programa de alineamiento múltiple ClustalW (*Nucleic Acids Research* (1994) 22, 4673-4680; *Nucleic Acids Research* (1997), 24, 4876-4882) es una forma adecuada de generar múltiples alineamientos de polipéptidos o polinucleótidos. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineamientos de polinucleótidos: Penalización por abertura de hueco = 15.0, Penalización por extensión de hueco = 6.66 y Matriz = Identidad. Para alineamientos de polipéptidos: Penalización por abertura de hueco = 10.0, Penalización por extensión de hueco = 0.2 y Matriz = Gonnet. Para alineamientos de ADN y proteínas: ENDGAP = -1 y GAPDIST = 4. Los expertos en la técnica serán conscientes de que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para un alineamiento de secuencia óptimo. Adecuadamente, el cálculo de los porcentajes de identidades se calcula entonces a partir de un alineamiento tal como (N/T) , donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un resto idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas, incluyendo huecos pero excluyendo segmentos protuberantes.

Aspectos y realizaciones pueden proporcionar un medio para discernir entre variantes de proteínas. Una "variante" significa una secuencia sustancialmente similar. Una variante puede tener una función similar o una función sustancialmente similar a una secuencia de tipo natural. Una función similar puede ser al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la función de la enzima de tipo natural o al menos aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la función de la enzima de tipo natural. Las variantes pueden tener una o más mutaciones que dan como resultado que la enzima tenga un nivel de actividad modulado en comparación con el polipéptido de tipo natural. Por ejemplo, las variantes pueden ser proteínas mutantes producidas introduciendo cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glucosilación; cambios que afectan al repliegado o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados de asociación), siempre que todavía tengan parte o toda su función o actividad. Dichas variantes se pueden producir introduciendo cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos;

cambios en los estados de glucosilación; cambios que afectan el repliegado o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados de autoasociación), que se pueden diseñar deliberadamente o aislar de forma natural.

5 Los métodos de acuerdo con algunos aspectos y realizaciones pueden permitir, por ejemplo, la captura de cambios sutiles que se alejan de una estructura de proteína natural y, por ejemplo, cualquier cambio en la dinámica natural de una proteína. Aspectos y realizaciones descritas combinan la modelización numérica, el cálculo de estructuras y el análisis biofísico para validar la estrategia general.

10 Algunos aspectos y realizaciones usan el efecto de REES para proporcionar una comprensión cuantitativa del desplazamiento biomolecular de borde (QUBES). El método QUBES puede permitir que las mediciones de REES reunidas en relación con una muestra de proteína produzcan una huella espectral 2D. Algunos aspectos y realizaciones proporcionan una huella generada en relación con una muestra de proteína para comparar con una huella de referencia en una biblioteca de referencia de muestras de proteínas previamente reunidas para determinar la calidad de la muestra de proteína que se está estudiando.

15 La "calidad" de la muestra de proteína se puede referir, pero no se limita a uno o más del estado conformacional de la proteína en dicha muestra de proteína, el amontonamiento ("*crowding*") de la proteína en la muestra de proteína, la compacidad física de la proteína en la muestra de proteína; la estabilidad de la proteína en la muestra de proteína; y/o la agregación de la proteína en la muestra de proteína.

Algunos aspectos y realizaciones se refieren a la detección del desplegado de proteínas y/o la formación de agregados de proteínas, incluyendo agregados de proteínas solubles.

20 Algunos aspectos y realizaciones se refieren a cuantificar el desplegado de proteínas y/o la formación de agregados solubles, incluyendo agregados de proteínas solubles.

Algunos aspectos y realizaciones se refieren a la predicción de la estabilidad de la muestra.

25 Los métodos descritos en la presente memoria pueden tener una serie de ventajas, que incluyen: (i) la adquisición y análisis de datos es rápido (<5 min), por lo que se puede usar como parte del cribado a gran escala; (ii) se puede usar con cualquier proteína que incluya uno o más restos de Trp (la mayoría de las proteínas); (iii) se puede usar con proteínas de cualquier tamaño y en casi cualquier entorno de solvatación/tampón; (iv) las mediciones pueden ser de alta capacidad (placa de 96 pocillos); (v) las muestras no se consumen; (vi) el planteamiento requiere solo una concentración de muestra baja; y (vii) un solo valor captura un conjunto completo de información sobre la conformación de la proteína. Aspectos y realizaciones reconocen que el uso de efectos de fluorescencia para analizar la estructura de una proteína puede tener varias ventajas que incluyen, por ejemplo, que: (i) la adquisición y análisis de datos es rápido (<5 min), por lo que se puede usar en un punto de uso; (ii) se puede usar con cualquier proteína que incluya uno o más aminoácidos fluorescentes que se encuentran naturalmente (fluoróforos intrínsecos), y en particular aquellos con restos de Trp (la mayoría), o proteínas que tienen fluoróforos extrínsecos seleccionados adecuadamente; (iii) se puede usar con proteínas de cualquier tamaño y en casi cualquier entorno de solvatación/tampón; (iv) las mediciones pueden ser de alta capacidad; (v) las muestras no se consumen; y (vi) el planteamiento típicamente requiere solo una pequeña concentración de muestra.

40 En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de una serie de estados conformacionales discretos de una proteína en la muestra de proteína. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de un paisaje de energía libre de una proteína en la muestra de proteína. En otras palabras, los espectros de fluorescencia producidos por una muestra de proteína pueden proporcionar una indicación inherente de la rugosidad del paisaje de energía libre de una muestra de proteína.

45 En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de una magnitud de la curvatura de la relación entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína. En particular, la curvatura de la relación entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína proporciona una indicación de la magnitud del efecto de borde de fluorescencia, por ejemplo, efecto de REES, mostrado por una muestra de proteína. La magnitud de ese efecto puede proporcionar una indicación inherente, relativa o comparativa de la naturaleza, por ejemplo, el número de estados conformacionales disponibles para la proteína en la muestra de proteína. Por consiguiente, la magnitud del efecto de desplazamiento de borde de fluorescencia observado puede proporcionar una indicación de la "rugosidad" del paisaje de energía libre de una proteína en una muestra de proteína.

50 En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de una naturaleza relativa plegada o desplegada del estado conformacional de una proteína en la muestra de proteína. En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de amontonamiento de una proteína en la muestra de proteína.

En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de compacidad física de una proteína en la muestra de proteína.

En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína comprende: una indicación de estabilidad de una proteína en dicha muestra de proteína.

- 5 En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína comprende: una indicación de agregación de una proteína en dicha muestra de proteína. En algunas realizaciones, la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína comprende: una indicación de la indicación característica de la respuesta de fluorescencia que se determina que es independiente a lo largo de un intervalo de longitudes de onda de excitación. Por consiguiente, en un amplio intervalo de longitudes de onda de excitación, la respuesta de fluorescencia de una muestra de proteína puede ser sustancialmente uniforme. Esa respuesta de fluorescencia base puede proporcionar información sobre la naturaleza plegada inherente, comparativa o relativa de una proteína dentro de una muestra de proteína.

- 10 En algunas realizaciones, la relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína comprende: una función exponencial, o una función de probabilidad exponencial simétrica o asimétrica. La relación puede comprender una gaussiana, una gaussiana sesgada o una suma de exponenciales. Dichos "modelos" matemáticos o numéricos para muestras de proteínas concuerdan con la forma general del comportamiento físico esperado de una proteína configurada para presentar efectos de fluorescencia.

- 15 En algunas realizaciones, la relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína comprende:

una distribución de probabilidad gaussiana de la forma:

$$f(x) = R_0 + \frac{A\sqrt{2/\pi}}{w} \exp\left(-2\left(\frac{x-m}{w}\right)^2\right)$$

Ec. 2

- 20 Donde A es el área, w es la anchura a mitad de altura máxima (fwhm), m es el punto medio y R₀ es la intersección en y, y $m = \lambda_{REES}^{max}$, donde λ_{REES}^{max} es la longitud de onda de excitación que da el cambio mayor en la longitud de onda del pico de emisión de fluorescencia.

- 25 En algunas realizaciones, la muestra de proteína comprende: una proteína, disolvente y tampón, y la indicación de al menos una característica del estado conformacional comprende una indicación del estado conformacional de la proteína en el disolvente y tampón. Se entenderá que el(los) estado(s) conformacional(es) tomado(s) por una proteína dependerán de la concentración de proteína, disolvente y tampón dentro de una muestra de proteína y que la fluorescencia de una muestra de proteína dependerá del estado de solvatación de una proteína.

- 30 En algunas realizaciones, la indicación de la indicación característica de la respuesta de fluorescencia que se determina que es independiente a lo largo de un intervalo de longitudes de onda de excitación, y la indicación de una magnitud de curvatura de la relación entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de la muestra de proteína, comprenden una huella característica de la muestra de proteína. Por consiguiente, para una muestra de proteína dada, puede ser posible determinar una huella o característica indicativa de, por ejemplo, el paisaje de energía libre o la "rugosidad" de una muestra de proteína y el "plegamiento" de una muestra de proteína en un forma natural. Dicha huella se puede generar analizando una muestra de proteína inmediatamente después de la fabricación. La comparación de la huella de una muestra de proteína "idéntica", por ejemplo, una muestra de proteína de ese lote, algún tiempo después de la fabricación puede ofrecer una indicación de si esa muestra de proteína tiene una conformación (estructura) suficientemente similar para funcionar todavía como se esperaba en el punto de fabricación. La huella puede comprender dos o más valores característicos o indicativos de una característica de la muestra de proteína. En otras palabras, la huella puede ser bidimensional, tridimensional o multidimensional.

- 35 En algunas realizaciones, el método comprende: generar la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína para una pluralidad (por ejemplo, dos o más) de diferentes muestras de proteína. Por consiguiente, puede ser posible generar una tabla de consulta que comprenda al menos una indicación "ideal" en relación con una o más muestras de proteínas.

- 40 En algunas realizaciones, el método comprende: generar la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína para una pluralidad (por ejemplo, dos o más) de diferentes muestras de proteína que tienen un alto grado de similitud de secuencia, como se ha descrito en la presente memoria.

- 45 En algunas realizaciones, el método comprende: comparar la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína con una indicación generada previamente de al menos una característica del estado conformacional de una muestra de proteína adicional. Por consiguiente, la muestra de proteína adicional

se puede comparar frente a características determinadas de una muestra de proteína, o conjunto de muestras de proteína, para las cuales se conoce la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína, para identificar la muestra de proteína adicional. Es decir, la muestra de proteína adicional se puede comparar frente a una tabla de consulta en relación con una o más muestras de proteínas "conocidas" con el fin de identificar la muestra de proteína adicional.

En algunas realizaciones, el método comprende: comparar la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína con una indicación generada previamente de al menos una característica del estado conformacional de una muestra de proteína idéntica. Por consiguiente, una muestra de proteína se puede comparar frente a determinadas características de una muestra de proteína "ideal" (por ejemplo, un control) para determinar si todavía puede tener una estructura que se considere adecuada para su propósito. Dichos arreglos pueden permitir un mecanismo para realizar análisis de QC no destructivos en relación con una muestra de proteína.

En algunas realizaciones, el método comprende: comparar la indicación de al menos una característica del estado conformacional de la muestra de proteína, con una indicación de al menos una característica del estado conformacional de una muestra de proteína que comprende la misma proteína que tiene diferentes uno o más de: concentración, disolvente y tampón. Por consiguiente, dado que los métodos pueden permitir que se determinen propiedades inherentes de una muestra de proteína, el método puede permitir que los formuladores identifiquen, mediante la comparación entre muestras de proteína, un almacenamiento estable (disolvente y tampón) para una proteína dada, permitiendo así mayor vida útil de las proteínas biológicas posiblemente utilizables.

En algunas realizaciones, la muestra de proteína comprende: una proteína que incluye al menos un fluoróforo intrínseco. En algunas realizaciones, el fluoróforo intrínseco comprende: triptófano.

En algunas realizaciones, la muestra de proteína comprende una proteína que incluye al menos un fluoróforo extrínseco. Un segundo aspecto proporciona un producto de programa informático operable, cuando es ejecutado por un ordenador, para realizar el método del primer aspecto.

Un tercer aspecto proporciona una unidad de análisis estructural de proteínas según la reivindicación 14.

La unidad de análisis estructural de proteínas del tercer aspecto se puede configurar adecuadamente para proporcionar y llevar a cabo cualquiera de las características y métodos descritos con más detalle en relación con las realizaciones del primer aspecto.

Un cuarto aspecto puede proporcionar un aparato de análisis estructural de proteínas que comprende: un soporte de muestra configurado para recibir una muestra de proteína; una fuente de luz controlable operable para excitar la muestra de proteína; un detector operable para recibir un espectro de emisión de fluorescencia producido por la muestra de proteína; y una unidad de control configurada para la comunicación con la fuente de luz controlable y el detector, comprendiendo la unidad de control una unidad de análisis estructural de proteínas según el tercer aspecto.

Cuando se describe una característica del aparato como operable para proporcionar una función, se apreciará que esto incluye una característica del aparato que proporciona esa función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle, con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

Las figuras 1a y 1b ilustran cómo una proteína de ejemplo, NEMO W6, presenta un efecto de REES significativo;

La figura 1a es un diagrama de contorno que muestra el cambio en la estructura de los espectros de emisión con λ_{Ex} creciente. La línea discontinua de la figura 1a ilustra el cambio en λ_{Em}^{max} para cada espectro de emisión y se proporciona solo como una ayuda visual;

La Figura 1b ilustra esquemáticamente el cambio relativo de la intensidad de la emisión de W6 (λ_{Em}^{max} mostrado como una línea discontinua como ayuda visual) para λ_{Ex} creciente.

La Figura 1b (inserto) ilustra esquemáticamente el cambio correspondiente en CSM con λ_{Ex} junto con un ejemplo de cálculo de ajuste lineal;

La Figura 2 ilustra un modelo fenomenológico que se ajusta a los datos de REES. El espectro de excitación de NEMO W6 (emisión a 348 nm) se muestra como una línea gris (eje de la derecha) a través de un intervalo extenso de longitudes de onda. La variación en CSM con λ_{Ex} para NEMO W6 se muestra como círculos negros (eje izquierdo) y la línea continua es un ejemplo de línea de ajuste curva que comprende una suma de dos gaussianas que capturan la rama ascendente y descendente de los datos de REES obtenidos experimentalmente;

La Figura 3 ilustra gráficamente el efecto de la desnaturalización y amontonamiento en los datos de REES para NEMO.

Los datos de REES para NEMO natural (círculos negros), NEMO desnaturalizado (círculos rojos) y NEMO amontonado (Sbi 20 mg/ml) se ajustan a una línea de ajuste curva de ejemplo que comprende una suma de dos gaussianas que capturan la rama ascendente y descendente de los datos de REES obtenidos experimentalmente. El inserto muestra el valor extraído de A de la línea de ajuste curva de ejemplo, y es indicativo de la curvatura de los datos de REES;

5 La Figura 4 ilustra gráficamente que el efecto de REES es sensible a la variación de presión;

La figura 4a ilustra gráficamente la variación en REES con el aumento de presión. Las líneas discontinuas son los ajustes a una línea de ajuste curva de ejemplo que comprende una suma de dos gaussianas que capturan la rama ascendente y descendente de los datos de REES obtenidos experimentalmente;

10 La Figura 4b ilustra gráficamente la dependencia de la presión de A extraída de los ajustes de datos mostrados en la Figura 4a;

La Figura 5 ilustra gráficamente un marco conceptual para la interpretación de datos de REES del triptófano en proteínas;

La Figura 6 ilustra gráficamente que el cambio conformacional inducido por el ligando se produce alterando el equilibrio existente de los estados conformacionales de NEMO;

15 La Figura 6a ilustra gráficamente un cambio en los datos de REES en la unión de los péptidos I κ B α e IKK- β ; la línea continua en cada caso comprende el ajuste a una línea de ajuste curva de ejemplo que comprende una suma de dos gaussianas que capturan la rama ascendente y descendente de los datos de REES obtenidos experimentalmente.

La inserción ilustra gráficamente la magnitud relativa extraída de A del ajuste;

20 La Figura 6b ilustra gráficamente un cambio en los datos de REES en la unión de diferentes longitudes de cadena de poliubiquitina; la línea continua es el ajuste a una línea de ajuste curva de ejemplo que comprende una suma de dos gaussianas que capturan la rama ascendente y descendente de los datos de REES obtenidos experimentalmente. El inserto ilustra gráficamente la magnitud relativa extraída de A del ajuste;

Las figuras 7a a 7d comprenden datos experimentales de respaldo de antecedentes:

25 La figura 7a ilustra el espectro de emisión de tirosina excitada a 292 nm. Se muestran los espectros sin procesar, espectros de tampón y el espectro de diferencia;

La figura 7b ilustra el espectro de emisión de NEMO 2 μ M y tirosina 10 μ M (de A) excitada a 292 nm. La emisión total de Tyr es 0.5% de la emisión total de NEMO;

30 La figura 7c ilustra el espectro de emisión de NEMO excitado a 292 nm (línea negra; eje izquierdo) y 310 nm (línea azul; eje derecho). Las líneas gris y cian muestran la sustracción del espectro de emisión de Tyr 10 μ M de los espectros de emisión de NEMO a 292 nm y 310 nm, respectivamente;

La figura 7d ilustra el efecto de REES resultante para NEMO (negro) y para los espectros sustraídos de Tyr para Tyr 10 μ M (rojo).

La figura 8 ilustra que Sbi no muestra un efecto de REES significativo;

35 La figura 8 a es un diagrama de contorno que muestra el cambio en la estructura de los espectros de emisiones con λ_{Ex} creciente. La línea blanca discontinua muestra el cambio en λ_{Em}^{max} para cada espectro de emisión solo como ayuda visual;

La figura 8b ilustra gráficamente el cambio relativo de la intensidad de emisión de W6 (λ_{Em}^{max} mostrado como una línea negra discontinua, solo como ayuda visual, para λ_{Ex} creciente.

40 El inserto de la figura 8b muestra gráficamente, el cambio correspondiente en CSM con λ_{Ex} calculado a partir de un ajuste lineal;

La figura 9 ilustra la dependencia de la presión de la emisión de Trp libre que es insignificante en comparación con NEMO W6 y no muestra un efecto de REES;

La figura 9a ilustra esquemáticamente una comparación de datos de REES de baja y alta presión para NEMO W6 y Trp libre;

45 La figura 9b ilustra esquemáticamente datos de diferencia que muestran el cambio en el efecto de REES tanto para NEMO W6 como para Trp libre;

La figura 10a ilustra esquemática la excitación y posterior relajación por emisión fluorescente de una muestra de proteína que comprende una proteína en un solvato que incluye iones de tampón;

La figura 10b ilustra varios espectros de emisión obtenidos de la muestra de proteína de la figura 10a;

La figura 10c ilustra gráficamente una comparación de la longitud de onda de emisión (eje x) a la longitud de onda de excitación (eje y) para la muestra de proteína de la figura 10a;

5 La figura 11 ilustra esquemáticamente las partes componentes principales del aparato configurado para registrar fenómenos de desplazamiento óptico en algunos arreglos;

Las figuras 12a a 12c proporcionan una visión general de la estructura y análisis de proteínas de acuerdo con un arreglo que usa el efecto de REES como un indicador específico de la estructura de mAb;

La Figura 12a ilustra esquemáticamente una estructura general de la región de unión al antígeno del fragmento (Fab) de una variedad de mAb;

10 La figura 12b ilustra esquemáticamente datos de REES de ejemplo para un mAb y muestra un arreglo en el que una función gaussiana se ajusta a datos empíricos;

La figura 12c ilustra esquemáticamente una gráfica de ejemplo de parámetros extraídos de una función gaussiana ajustada a datos empíricos como en la figura 12b para una serie de mAb diferentes;

15 Las figuras 13A a D ilustran los valores de QUBES para una variedad de mAb cuando se ajustan a una función exponencial;

Las figuras 14A a D muestran cómo los valores de QUBES se pueden usar para reflejar y diferenciar entre el desplegado del mAb y la formación de agregados en etapas tempranas;

Las figuras 15A a E comparan la sensibilidad de los valores de QUBES con los perfiles DLS;

Las figuras 16A a D muestran cómo QUBES se puede usar para predecir la estabilidad termodinámica;

20 La figura 17 muestra las diferentes capacidades de detección de QUBES; y

Las figuras 18 - 21 son figuras de respaldo.

Descripción de las realizaciones

25 Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que los entendidos habitualmente por los expertos en la técnica, tales como en química física, química de proteínas, biología de proteínas y bioquímica. Salvo que se indique lo contrario, se usan técnicas convencionales para métodos químicos y bioquímicos.

30 Antes de describir los arreglos en detalle, se proporciona una descripción general. En el estudio de las proteínas, y en particular de las proteínas biológicas tales como los anticuerpos, se admite que para comprender las interacciones moleculares complejas es útil tener en cuenta la flexibilidad molecular y el equilibrio disponible de los estados conformacionales.

35 Se entiende que las técnicas de RMN proporcionan las mejores imágenes de estructuras de proteínas en términos de resolución, pero las técnicas de RMN requieren un equipo especializado y requieren mucho tiempo. Es deseable proporcionar una herramienta de análisis estructural que sea rápida y pueda proporcionar información relacionada con la flexibilidad molecular. Se admite que, independientemente del nivel de estructura de la proteína que se considere (cuaternario, terciario, secundario), lo primero que se "desnaturaliza" es la flexibilidad normal de la molécula.

40 La flexibilidad de una proteína está codificada en el plegado por la secuencia primaria y también se ve afectada por el entorno que rodea la proteína, por ejemplo, la viscosidad del disolvente, salinidad, pH, amontonamiento y similares. La flexibilidad natural de una proteína se puede deteriorar muy fácilmente, por ejemplo, como resultado de pequeños cambios en la temperatura, viscosidad, pH, concentración de proteínas y similares. Se admite que la flexibilidad de la proteína está relacionada con diferentes funciones de la proteína, que incluyen, por ejemplo, unión de ligando, actividad enzimática, localización celular.

45 Se entiende cada vez más que el mecanismo molecular de muchas proteínas humanas, en particular las implicadas en las redes de señalización, se rige por la flexibilidad molecular y la alteración estructural de las proteínas. Es decir, las proteínas que median múltiples entradas de señalización se pueden plegar en conformaciones específicas de ligando, proporcionando alta especificidad a un gran número de ligandos estructuralmente diferentes [1]. Sosteniendo estas nociones está el modelo de estructura de proteínas del paisaje de energía libre (FEL), que interpreta la heterogeneidad molecular (desorden y flexibilidad estructurales), como una serie de mínimos energéticos equilibrados en una superficie de energía libre multidimensional [2]. Se considera que las proteínas que son muy flexibles o que existen como estados conformacionales discretos significativamente diferentes tienen un FEL bastante "rugoso". Para
50 las proteínas de señalización, comprender cómo se altera el FEL en la unión del ligando es clave para comprender el mecanismo molecular de las redes de señalización biológica.

La detección del cambio conformacional inducido por el ligando (plegamiento) y la relación con el equilibrio de los estados conformacionales de la proteína es un reto. EPR [3] de molécula única (SM) [4,5]. Se pueden usar estudios de espectrometría de masas de movilidad iónica (IM-MS) [6] y RMN [7] para este propósito con diferentes niveles de resolución.

5 Los arreglos muestran que los desplazamientos de borde en los espectros de emisión de fluorescencia generados por una muestra de proteína (por ejemplo, proteína en una solución adecuada, junto con iones de tampón adecuados) pueden proporcionar información sobre la estructura de la proteína. Los arreglos experimentales descritos más adelante demuestran que un posible desplazamiento de borde útil puede comprender un fenómeno óptico llamado Desplazamiento de excitación de borde al rojo (REES). REES de una muestra de proteína puede proporcionar información única sobre el cambio conformacional de proteínas y el equilibrio de los estados conformacionales [8].

En general, los arreglos exploran técnicas físicas ópticas que controlan la emisión de los fluoróforos de una muestra de proteína. En otras palabras, aspectos muestran que se pueden usar espectros de fluorescencia de una muestra de proteína para caracterizar la configuración física de esa muestra de proteína.

15 Está contemplado cualquier tipo de proteína de ensayo para usar en la presente descripción con la condición de que se pueda analizar por métodos ópticos. Para demostrar la posibilidad de usar métodos ópticos para evaluar la flexibilidad de las proteínas, se ha mostrado que muchas proteínas tienen un fluoróforo (triptófano) que se encuentra de forma natural (intrínseco), muy conveniente que es muy brillante y responde a los cambios en su entorno. Los restos de triptófano (Trp) en las proteínas son indicadores extremadamente sensibles del entorno molecular inmediato. Los restos de Trp pueden presentar un desplazamiento en su máximo de emisión con una energía de excitación decreciente, porque los fotones de menor energía excitan selectivamente estados conformacionales discretos del sistema Trp-disolvente, el llamado efecto de desplazamiento de excitación de borde al rojo (REES). El efecto de REES del Trp es una herramienta poderosa que informa sobre el perfil dinámico de las proteínas reflejando el equilibrio de los estados conformacionales de las proteínas caracterizados por un paisaje de energía libre (FEL) de las proteínas. Por lo tanto, este planteamiento se puede desarrollar para proporcionar una detección sensible de cambios en un perfil dinámico de proteínas, así como de la conformación general. El efecto de REES observado para las proteínas multi-Trp puede actuar como una huella muy precisa que refleja diferencias sutiles tanto en la estructura tridimensional como en la flexibilidad de la proteína.

Los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos monoclonales (mAb), son un ejemplo de proteínas de ensayo que se pueden usar de acuerdo con la presente descripción, puesto que dependen de la flexibilidad de la proteína natural para su función; y en general son estructuralmente similares, por lo que la identificación de una característica que sea ligeramente variable puede ser comparable entre los anticuerpos de ensayo para identificar cualquier tendencia en los datos experimentales obtenidos. Además, los anticuerpos típicamente contienen numerosos restos de Trp que son asequibles por espectroscopía y muestran cambios de emisión con cambios en el entorno circundante. El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y cubre mAb, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos remodelados, fragmentos de anticuerpos y proteínas inmunitarias pequeñas (SIP) (véase, por ejemplo, *Int. J. Cancer* (2002) 102, 75-85). Un anticuerpo puede incluir una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de un objetivo de interés o parte del mismo. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo, tal como IgG, IgE, IgM, IgD e IgA, y de cualquier clase, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2, o una subclase de los mismos. El anticuerpo puede ser o puede derivar de especies murina, humana, conejo o de otras.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; anticuerpos de dominio único, incluyendo dAb, anticuerpos de camélidos VHH y los anticuerpos IgNAR de peces cartilaginosos. Los anticuerpos y sus fragmentos se pueden sustituir por moléculas de unión basadas en armazones alternativos no inmunoglobulínicos, aptámeros peptídicos, aptámeros de ácido nucleico, polipéptidos estructurados que comprenden bucles de polipéptidos subtendidos en una cadena principal no peptídica, receptores naturales o dominios de los mismos.

50 Los mAb son de particular interés en la presente descripción. Los mAb son específicos, se dirigen contra un único sitio antigénico y se dirigen contra un único determinante en el antígeno. Los mAb se pueden preparar por el método de hibridoma descrito en *Nature* (1975) 256:495, o se pueden hacer por métodos de ADN recombinante o se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos como se describe en *J. Mol. Biol.* (1991), 222:581 - 597. El mAb puede incluso ser un anticuerpo "quimérico" en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular. La o las cadenas restantes son idénticas u homólogas a secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase *PNAS* (1994) USA, 81: 6851-6855).

60 El anticuerpo puede ser un "anticuerpo humanizado", es decir, inmunoglobulinas humanas en las que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana

(véase *Curr. Op. Struct. Biol.* (1992), 2:593-596). El anticuerpo puede ser un "anticuerpo remodelado". Esto se refiere a anticuerpos no humanos o humanizados (p. ej., anticuerpos quiméricos o injertados con CDR) que se han diseñado para reemplazar ciertos restos de aminoácidos expuestos al disolvente para reducir su inmunogenicidad o mejorar su función. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico que puede comprender una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano genéticamente modificado.

El anticuerpo puede ser un fragmento funcionalmente activo, derivado o análogo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno deseado y que todavía reconoce el mismo antígeno que el anticuerpo del que derivaba el fragmento, derivado o análogo. Los fragmentos de anticuerpos adecuados pueden incluir fragmentos F(ab')₂ (que comprenden la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH₁ de la cadena pesada) y fragmentos Fab, dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fv o anticuerpos de cadena sencilla (SCA), anticuerpos de dominio único (dAb, IgNAR, VHH) o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Los derivados y análogos de anticuerpos también están contemplados y pueden incluir los que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación y/o derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína. Las modificaciones químicas se pueden llevar a cabo por técnicas conocidas, tales como la escisión química específica, acetilación y/o formilación.

Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo-fármaco o un fragmento funcionalmente activo de un anticuerpo, por ejemplo, en el que el anticuerpo está fusionado mediante un enlace covalente (p. ej., un enlace peptídico), en el extremo N o el extremo C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una porción de la misma, tal como al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos se pueden obtener en el mercado de una amplia variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, está disponible una variedad de líneas de hibridomas secretoras de anticuerpos en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va.). Se ha depositado una gran cantidad de anticuerpos contra diversos objetivos de enfermedades en el ATCC y/o se han publicado secuencias de región variable.

En una realización, el anticuerpo es un mAb humano.

La proteína o el anticuerpo pueden estar unidos a un fármaco. Puede ser una proteína terapéutica o un anticuerpo. El fármaco puede ser un agente citotóxico que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo análogos sintéticos y derivados de las mismas.

Adecuadamente, la proteína para usar en la presente descripción está en forma purificada o aislada, lo cual incluye una proteína identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Por lo tanto, una proteína aislada o purificada está sustancialmente exenta de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una proteína que está sustancialmente exenta de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Adecuadamente, la proteína se purificará a más de 90% en peso o 95% en peso determinado por el método de Lowry, y lo más adecuadamente, a más de 99% en peso, o a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Normalmente, la proteína purificada o aislada se preparará por al menos una etapa de purificación. La purificación de la proteína puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán a la proteína; una o más etapas de columna sobre dichas resinas de afinidad; una o más etapas que implican cromatografía de interacción hidrófoba; o cromatografía de inmunoafinidad. Alternativamente, la proteína también se puede expresar en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, se puede expresar como una proteína de fusión, tal como las de polipéptido de unión a maltosa, glutatión-5-transferasa, marcador de his o tiorredoxina. La proteína se puede marcar con un epítipo y posteriormente purificar usando un anticuerpo específico dirigido contra dicho epítipo. Se pueden usar una o más etapas de cromatografía líquida, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa para purificar más la proteína. Se pueden usar algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diferentes combinaciones, para proporcionar una proteína sustancialmente homogénea. En ciertas realizaciones, se usa la misma proteína pero en diferentes formulaciones o en diferentes tiempos de medición o en presencia de diferentes agentes y similares.

Una aplicación particular de la presente descripción se refiere al QC de proteínas fabricadas, tales como proteínas biofarmacéuticas y/o proteínas recombinantes. Todos los sistemas de producción biológica son susceptibles de

5 cambios genéticos a través de mutación y los genes extraños insertados en las células hospedantes pueden presentar mayor inestabilidad genética. Las proteínas expresadas en hospedantes extraños se pueden desviar estructuralmente de sus homólogas originales, originalmente previstas o naturales. Estos cambios pueden surgir a nivel postraduccional o durante la producción o purificación de la proteína y pueden dar como resultado que la proteína tenga un cambio en la estabilidad o un cambio en su comportamiento de agregación y similares. Esto puede conducir a efectos no deseados, incluyendo los efectos clínicos no deseados. Esto puede suceder con el transcurso del tiempo. Además, el "aumento de escala" extensivo de la fermentación y/o purificación que puede ocurrir durante el aumento a la producción comercial a gran escala, puede tener consecuencias considerables en la calidad del producto proteínico, incluyendo efectos en la estructura conformacional y la agregación y similares. El mantenimiento de la actividad biológica tanto durante como después de la fabricación generalmente depende de la conformación molecular de la proteína. Las proteínas también pueden ser particularmente sensibles a factores ambientales, tales como cambios de temperatura, factores oxidantes, exposición a la luz y condiciones de almacenamiento. Las proteínas también pueden ser particularmente sensibles a los cambios en la formulación. Los ensayos realizados a nivel de proteína usando los aspectos y realizaciones de la presente descripción se pueden usar para ensayar o comparar el producto de proteína que se produce. Opcionalmente, el producto de proteína se puede comparar con productos de proteína conocidos (por ejemplo, control) para determinar el grado de variación del mismo. Opcionalmente, el producto de proteína se puede comparar con una huella para un producto de proteína conocido (por ejemplo, control) para determinar el grado de variación del mismo. Opcionalmente, el producto de proteína se puede comparar con una tabla de consulta que comprende al menos una indicación "ideal" en relación con una o más muestras de proteína para determinar el grado de variación de la misma. Opcionalmente, el producto de proteína se puede comparar a lo largo del tiempo. Basándose en el grado de variación que se obtiene, se puede tomar una decisión sobre si la estabilidad/calidad del producto de proteína es aceptable o no. Ventajosamente, los aspectos y realizaciones de la presente descripción se pueden llevar a cabo en diversas etapas o tiempos del proceso de fabricación para controlar la estabilidad/calidad del producto de proteína antes y/o durante y/o al final de la producción. Ventajosamente, los aspectos y realizaciones de la presente descripción se pueden llevar a cabo al final de la producción para determinar el impacto de las condiciones/tiempo de almacenamiento en la proteína.

30 Están previstas otras aplicaciones de los aspectos y realizaciones, que incluyen, por ejemplo, el ensayo del diseño y/o rediseño de proteínas, tales como proteínas biofarmacéuticas y/o proteínas recombinantes. El diseño y/o rediseño puede implicar el uso de cambios genéticos a través de mutación que puede alterar la conformación/estabilidad de la proteína y/o la agregación de la proteína. El diseño y/o rediseño puede implicar la unión de otra molécula a la proteína, tal como un fármaco, lo cual puede afectar a la conformación/estabilidad y/o agregación de la proteína. Los ensayos realizados a nivel de proteína usando los aspectos y realizaciones de la presente invención se pueden usar para determinar el impacto del diseño y/o rediseño en la proteína. Si se determina que el diseño y/o rediseño de la proteína tiene un impacto negativo en la proteína, entonces se pueden hacer más cambios para optimizar el diseño y/o rediseño de la proteína.

40 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para interpretar si el cambio en la formulación de una sal farmacéutica tiene un impacto en la calidad de la proteína. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, incluyen las mencionadas por Berge et al, en *J.Pharm.Sci.* 66, 1-19 (1977). Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas e incluyen sales de hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, trifluoroacetato, gluconato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, ascorbato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, formiato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato. Cuando están presentes uno o más restos ácidos, se pueden formar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas a partir de bases que forman sales no tóxicas e incluyen sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc y aminas farmacéuticamente activas tales como dietanolamina.

50 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para interpretar si la formulación de una proteína en una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) tal como por mezclamiento con uno o más agentes de formulación (por ejemplo, un vehículo, diluyente y/o excipiente adecuado o similares), tiene un impacto en la calidad, estabilidad o conformación de la proteína. Adecuadamente, la formulación mantendrá o modulará (p. ej., aumentará) la calidad, estabilidad o conformación de la proteína. Adecuadamente, la formulación disminuirá la agregación o la probabilidad de agregación de la proteína. La composición puede ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y típicamente comprenderá uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente cualquier(cualesquiera) aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s) adecuados. Los ejemplos de vehículos incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes incluyen etanol, glicerol y agua. Los ejemplos de aglutinantes incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa fluida, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio,

benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo del modo de suministro previsto. La composición se puede usar en combinación con una ciclodextrina o un derivado de la misma. Se sabe que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión y no inclusión con moléculas de fármacos. La formación de un complejo de fármaco-ciclodextrina puede modificar la solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y/o propiedad de estabilidad de una molécula de fármaco. Los complejos de fármaco-ciclodextrina en general son útiles para la mayoría de las formas farmacéuticas y vías de administración. Como alternativa a la complejación directa con el fármaco, la ciclodextrina se puede usar como un aditivo auxiliar, p. ej. como un vehículo, diluyente o solubilizante. Otros factores que tienen impacto en una formulación incluyen composición tampón, pH, concentración de sal y similares.

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un método para formular una preparación de proteína que comprende: proporcionar una proteína en una muestra de proteína; llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha proteína en presencia de uno o más agentes de formulación; seleccionar uno o más agentes que mantienen o modulan (p. ej., aumentan) la calidad, estabilidad o conformación de la preparación de proteína en comparación con la calidad, estabilidad o conformación de la preparación de proteína en ausencia de uno o más agentes de formulación; y opcionalmente formular la preparación de proteína.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para formular una preparación de proteína que comprende: proporcionar una proteína en una muestra de proteína; llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha proteína en presencia de uno o más agentes de formulación; seleccionar uno o más agentes que disminuyen la agregación o la probabilidad de agregación de la preparación de proteínas en comparación con la agregación o la probabilidad de agregación de la preparación de proteína en ausencia de uno o más agentes de formulación; y opcionalmente formular la preparación de proteína.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para seleccionar una formulación de proteína óptima que comprende: proporcionar lotes de una proteína que contienen diferentes agentes de formulación; llevar a cabo el método según la presente descripción en dichos lotes de proteína en presencia de uno o más agentes de formulación; seleccionar uno o más agentes de formulación que mantienen o modulan (p. ej., aumentan) la calidad, estabilidad o conformación de la proteína en comparación con la calidad, estabilidad o conformación de la proteína en ausencia del uno o más agentes de formulación; y opcionalmente formular la preparación de proteína.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para seleccionar una formulación de proteína óptima que comprende: proporcionar lotes de una proteína que contienen diferentes agentes de formulación; llevar a cabo el método según la presente descripción en dichos lotes de proteína en presencia de uno o más agentes de formulación; seleccionar uno o más agentes de formulación que disminuyen la agregación o la probabilidad de agregación de la proteína en comparación con la agregación o la probabilidad de agregación de la proteína en ausencia del uno o más agentes de formulación; y opcionalmente formular la preparación de proteína.

La presente descripción también se puede usar para ensayar proteínas a lo largo del tiempo, tal como en ensayos por lotes de productos biofarmacéuticos y similares. Las proteínas a menudo se almacenarán durante un período de tiempo posterior a la fabricación y antes de su uso, y a menudo necesitan ensayos en una o más ocasiones para controlar su actividad. Con el tiempo, es común que las proteínas pierdan actividad o salgan de la solución y/o se agreguen.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, se proporciona un método para controlar la confirmación, estabilidad y/o plegamiento/desplegado de la proteína a lo largo del tiempo, que comprende proporcionar una proteína en una muestra de proteína; y llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha proteína en dos o más tiempos de medición diferentes; en donde una diferencia entre los resultados de los dos o más tiempos de medición diferentes es indicativa de un cambio en la actividad de la proteína con el tiempo.

Otras aplicaciones de los aspectos y realizaciones incluyen investigar la agregación de proteínas. Por ejemplo, se puede investigar la agregación de proteínas que puede ocurrir durante el almacenamiento o la función de la agregación de proteínas en proteínas implicadas en enfermedades, tal como la agregación de proteínas en proteínas amiloidogénicas implicadas en enfermedades neurodegenerativas. Dada la muy alta sensibilidad de los aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria para detectar agregados de proteínas solubles en proteínas, el uso del planteamiento puede proporcionar nuevas formas de control o detección de la agregación de proteínas que puede ocurrir durante el almacenamiento o la agregación de proteínas que puede ocurrir en enfermedades y/u ofrecer comprensión sobre la formación de estas especies potencialmente tóxicas. Aspectos y realizaciones también se refieren a la identificación de agentes que pueden modular (por ejemplo, disminuir) la agregación de proteínas, tal como durante el almacenamiento o en la enfermedad. Por lo tanto, aspectos y realizaciones también se refieren a métodos para identificar uno o más agentes de ensayo que modulan la agregación de proteínas o el plegamiento de proteínas. Como se usa en la presente memoria, el término "agente" se puede referir a una sola entidad o una combinación de entidades. El agente puede ser un compuesto orgánico u otro producto químico. El agente puede ser un compuesto, que se puede obtener o es producido por cualquier fuente adecuada, ya sea natural o artificial. El

agente puede ser una molécula de aminoácido, un polipéptido o un derivado químico de los mismos, o una combinación de los mismos. El agente puede ser incluso una molécula polinucleotídica, que puede ser una molécula paralela o antiparalela. El agente puede ser incluso un anticuerpo o una parte o partes del mismo. El agente se puede diseñar u obtener de una biblioteca de compuestos, que puede comprender péptidos, así como otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas. A modo de ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, hongos o células o tejidos animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un peptidomimético, un agente derivatizado, un péptido escindido de una proteína completa, un péptido sintetizado sintéticamente (tal como, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes) o combinaciones de los mismos, un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de la misma y mutantes, derivados o combinaciones de los mismos. El agente puede ser un compuesto orgánico. Típicamente, los compuestos orgánicos pueden comprender dos o más grupos hidrocarbilo. Aquí, la expresión "grupo hidrocarbilo" significa un grupo que comprende al menos C e H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes diferentes adecuados. Los ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halógeno, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no tienen que estar necesariamente unidos entre sí. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. Por lo tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. El agente puede comprender al menos un grupo cíclico. El grupo cíclico puede ser un grupo policíclico, tal como un grupo policíclico no fusionado. El agente puede comprender al menos uno de dichos grupos cíclicos unido a otro grupo hidrocarbilo. El agente puede contener grupos halógeno. El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alqueno, alqueno y alqueno, que pueden ser de cadena no ramificada o ramificada. El agente puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de adición de ácido o una sal de base, o un solvato del mismo, incluido un hidrato del mismo. Para una revisión sobre sales adecuadas, véase Berge et al, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66,1-19.

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un método para identificar uno o más agentes que modulan la agregación de proteínas o el plegamiento de proteínas que comprende: proporcionar una proteína en una muestra de proteína; llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha muestra de proteína en presencia y ausencia de uno o más agentes de ensayo que pueden modular la agregación del plegamiento de la proteína; y seleccionar uno o más agentes que modulan la agregación o el plegamiento de la proteína, en donde una diferencia en el nivel de agregación o plegamiento en presencia de los agentes de ensayo es indicativo de que el agente de ensayo modula la agregación o plegamiento de proteínas.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para controlar la agregación de proteínas a lo largo del tiempo que comprende proporcionar una proteína en una muestra de proteína; y llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha proteína en dos o más tiempos de medición diferentes; en donde una diferencia entre los resultados de los dos o más tiempos de medición diferentes es indicativa de un cambio en la agregación de la proteína a lo largo del tiempo.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para el cribado de agentes que modulan la agregación de proteínas que comprende proporcionar la proteína en una muestra, añadir un agente modulador, llevar a cabo el método expuesto en las reivindicaciones 1-20 y detectar la presencia o ausencia de cambio en la conformación o estabilidad de la proteína.

Un aspecto adicional más se refiere a un método para cribar uno o más agentes que modulan la agregación de proteínas que comprende: proporcionar una proteína en una muestra de proteína; llevar a cabo el método según la presente descripción en dicha muestra de proteína en presencia y ausencia de uno o más agentes de ensayo que pueden modular la agregación de la proteína; determinar la cantidad de agregación en presencia de los agentes de ensayo, en donde una disminución en la cantidad de agregación en presencia de los agentes de ensayo es indicativa de que el agente de prueba modula la agregación de proteínas.

Las figuras 10a a 10c ilustran en general el efecto de REES observado en algunas proteínas. La figura 10a ilustra esquemáticamente la excitación y posterior relajación por emisión fluorescente de una muestra de proteína que comprende una proteína en un solvato que incluye iones de tampón; la figura 10b ilustra varios espectros de emisión obtenidos de la muestra de proteína de la figura 10a; y la figura 10c ilustra gráficamente una comparación de la longitud de onda de emisión (eje x) con la longitud de onda de excitación (eje y) para la muestra de proteína de la figura 10a.

REES es un fenómeno donde la excitación de baja energía de un fluoróforo conduce a un desplazamiento al rojo del máximo de la intensidad de emisión, $\Delta\lambda_{Em}^{máx}$. Este fenómeno se puede poner de manifiesto donde hay un intervalo de estados discretos de solvatación del fluoróforo y, por lo tanto, refleja potencialmente el equilibrio de estados conformacionales que son accesibles para una proteína [8,9].

El efecto de REES se rige por las interacciones entre un fluoróforo y el disolvente de alrededor en los estados excitado y fundamental como se muestra en la Figura 10a. REES se observa como resultado del cambio en el momento dipolar

del fluoróforo después de la excitación y la velocidad a la que se produce la reorganización del disolvente alrededor del fluoróforo recién excitado [8,9]. En un entorno totalmente solvatado, el tiempo de vida de la fluorescencia (τ_F) es mucho mayor que el tiempo de vida de la relajación ambiental (τ_S). En este caso, la longitud de onda de emisión del cromóforo es independiente de la longitud de onda de excitación. Cuando $\tau_F < \tau_S$, por ejemplo, en un entorno molecular rígido, tal como algunos estados de proteínas plegadas, las interacciones intermoleculares entre el fluoróforo y su entorno no cambian y la relajación dipolar no se produce durante la emisión de fluorescencia [10,11]. Una consecuencia de esto es que la emisión de fluorescencia ocurre a mayor energía ya que los fotones son emitidos desde el estado excitado en lugar de un estado relajado de menor energía. Es posible seleccionar entornos de solvatación individuales dentro de un equilibrio usando excitación de baja energía (fotoselección), por ejemplo, usando fotones de menor energía o longitudes de onda más largas situadas en el borde hacia el rojo del espectro de excitación [12]. La excitación a una energía más baja selecciona fluoróforos en un entorno relajado de disolventes, que requieren menos energía para activarse. Experimentalmente se observa un "desplazamiento hacia el rojo" en el máximo de emisión con respecto a la longitud de onda de excitación.

Ha habido algunos informes en los que la emisión que procede de un solo resto de Trp produce un efecto de REES significativo en los estados plegado y de tipo glóbulo fundido [13], mientras que el efecto de REES desaparece o se reduce bastante en estados desplegados [14,15]. Por lo tanto, el efecto de REES es una sonda única para proteínas con un alto grado de flexibilidad molecular que da como resultado un conjunto de entornos de disolventes alrededor de la sonda de Trp. Para las proteínas, dicho conjunto puede proceder de un amplio equilibrio de estados conformacionales, tales como los glóbulos fundidos intermedios de proteínas altamente flexibles o dinámicas [14,16,17].

La figura 11 ilustra esquemáticamente las partes de componentes principales del aparato configurado para registrar espectros de emisión de fluorescencia y, por lo tanto, medir fenómenos de desplazamiento óptico en algunos arreglos. Con el fin de obtener datos de REES en relación con una proteína, se prepara una muestra de proteína. Esa muestra de proteína típicamente comprende: la proteína en una solución acuosa junto con iones de tampón adecuadamente seleccionados. La muestra de proteína se coloca en un soporte de células. La muestra se ilumina con luz colimada sustancialmente de una sola longitud de onda de una intensidad controlada y conocida. La muestra absorbe la energía de los fotones incidentes y, si los fluoróforos están presentes y en una posición física dentro de la proteína y la solución circundante que lo permite, la muestra de proteína puede presentar un espectro de emisión de fluorescencia. El espectro de emisión de la muestra de proteína se puede detectar adecuadamente mediante un detector y pasar ese espectro de emisión a una unidad de análisis (CPU). La excitación de la muestra de proteína se puede repetir en una pluralidad de longitudes de onda de excitación, y detectar y registrar los espectros de emisión de fluorescencia asociados. Si las longitudes de onda de excitación se eligen adecuadamente para que coincidan con el espectro de emisión de fluorescencia esperado de la proteína, puede ser posible analizar los diversos espectros de emisión obtenidos y obtener información relacionada con cualquier efecto de desplazamiento de borde, incluyendo, por ejemplo, el efecto de REES presentado por una muestra de proteína.

Un arreglo puede proporcionar un método experimental que comprende: recibir un espectro de emisión de fluorescencia generado por una muestra de proteína a una primera longitud de onda de excitación, estando configurada dicha muestra de proteína para presentar fluorescencia dependiendo de su estado conformacional; evaluar, a partir de dicho espectro de emisión de fluorescencia, una indicación característica de una respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína a dicha primera longitud de onda de excitación; repetir dichas etapas de recepción y evaluación en relación con una pluralidad de espectros de emisión de fluorescencia, cada espectro de fluorescencia generado por dicha muestra de proteína a una longitud de onda de excitación diferente de dicha primera longitud de onda de excitación; ajustar una relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína, comprendiendo dicha relación no lineal un modelo numérico indicativo de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína, basado en la correlación de dichas longitudes de onda de excitación recibidas y las indicaciones evaluadas asociadas características de dicha respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína.

Las Figuras 12a a 12c proporcionan una visión general de la estructura y análisis de proteínas de acuerdo con un arreglo que usa el efecto de REES como un indicador específico de la estructura de mAb. La Figura 12a ilustra esquemáticamente una estructura general de la región de unión al antígeno del fragmento (Fab) de una variedad de mAb y dicha proteína se puede ensayar en un aparato tal como el que se muestra y describe en relación con la figura 11.

La figura 12b ilustra esquemáticamente datos de REES de ejemplo para un mAb tal como el que se muestra en la figura 12a. La figura 12b muestra un arreglo en el que se ajusta una función gaussiana a datos empíricos. La figura 12c ilustra esquemáticamente una gráfica de ejemplo de parámetros extraídos de una función gaussiana ajustada a datos empíricos como en la figura 12b para una serie de mAb diferentes.

Se puede ver en la gráfica de la figura 12b que los datos empíricos de REES parecen presentar una curvatura general. Para identificar un modelo numérico que se ajuste mejor a los datos empíricos de REES, algunos arreglos, tal como la gráfica que se muestra en la figura 12b, examinan el cambio en el centro de masa espectral (CSM) de los espectros de emisión y lo comparan a lo largo de un intervalo extenso de longitudes de onda de excitación. Se apreciará que se

pueden comparar otros parámetros entre espectros. Por ejemplo, en lugar del CSM, se puede usar la longitud de onda de emisión máxima o similar.

En el ejemplo mostrado en la figura 12b, los datos de REES obtenidos empíricamente se pueden representar por (ajustar a) una distribución de probabilidad gaussiana de la forma

$$f(x) = CSM_0 + \frac{A\sqrt{A}}{w} \exp\left(-2\left(\frac{x-m}{w}\right)^2\right) \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde A es el área, w es la anchura a mitad de altura máxima (fwhm), m es el punto medio y CSM₀ es la intersección en y, y $m = \lambda_{REES}^{m\acute{a}x}$, donde $\lambda_{REES}^{m\acute{a}x}$ es la longitud de onda de excitación que da el cambio mayor en la longitud de onda del pico de emisión.

Los datos de REES obtenidos empíricamente presentan un buen ajuste a la ecuación 10 e ilustran la excitación de baja energía en el borde al rojo del espectro de absorción de la proteína. El ajuste de la ecuación 10 a los datos experimentales es bueno y captura las relaciones esperadas como se describe con más detalle en relación con experimentos específicos que se exponen a continuación con más detalle.

Algunos arreglos reconocen que la magnitud de A extraída del ajuste de la ecuación 10 a una gráfica de longitud de onda de excitación frente a $\lambda_{Em}^{m\acute{a}x}$, se puede usar como un comparador cualitativo para evaluar cambios en la extensión del fenómeno de REES observado. La magnitud de R₀ debe representar el valor mínimo de $\lambda_{Em}^{m\acute{a}x}$, en ausencia del efecto de REES. Esta magnitud se usa habitualmente para reflejar el grado de exposición al disolvente de, por ejemplo, restos de Trp en una muestra de proteína y se puede usar, por ejemplo, como una medición de estados plegados/desplegados de las proteínas. Ajustar los datos experimentales a un modelo numérico adecuado no recapitula el espectro de absorbancia/excitación de un fluoróforo, pero aún puede proporcionar una sonda físicamente significativa.

Los experimentos descritos con más detalle a continuación demuestran que el efecto de REES es sensible a los estados de las proteínas tanto desplegados, plegados como estabilizados según describen otros, y que un modelo numérico como el expuesto en la Ecuación 10 se puede ajustar con precisión a los datos obtenidos empíricamente. Después de establecer un modelo cuantitativo para comparar los datos de REES, se ensayó la hipótesis de que REES se puede usar para reflejar cambios en el equilibrio de los estados conformacionales de las proteínas. En particular, se controló el efecto de REES que se producía tanto con NEMO desnaturalizado como estabilizado, y se realizaron estudios de perturbación de presión que alteraban sistemáticamente el equilibrio de los estados conformacionales.

Basándose en el análisis de proteínas naturales, desnaturalizadas y estabilizadas, junto con una comprensión de la base teórica del efecto de REES, se llevaron a cabo experimentos para demostrar que la magnitud de REES es sensible a los cambios en el número de estados conformacionales en equilibrio discretos de una muestra de proteína.

La perturbación de la presión no desnaturalizante es una excelente herramienta para ensayar si REES es sensible a cambios en el número de estados conformacionales en equilibrio discretos de una muestra de proteína, ya que el cambio de presión actúa para perturbar un equilibrio preexistente de estados estructurales caracterizado por diferentes mínimos de energía en el FEL de la proteína [33]. La presión se ha usado como perturbación en una serie de estudios [34-36]. Se entenderá que la presión, a diferencia de la temperatura, no altera la energía interna del sistema, lo cual de otro modo podría ser un factor de confusión para las mediciones de REES. La observación de una dependencia significativa de la presión sobre el propio efecto de REES es, por lo tanto, una evidencia poderosa de que REES es sensible al equilibrio de estados conformacionales de las proteínas.

Los datos de dependencia de la presión se pueden ajustar adecuadamente a un modelo fenomenológico simple que implica una sola transición entre dos estados con presión hidrostática que cambia usado previamente [23,38]. El hallazgo clave de los datos de presión en el presente contexto es que el propio efecto de REES depende de la presión con la magnitud A que aumenta con la presión. Dado que la presión actúa para perturbar el equilibrio de los estados conformacionales, esta observación sugiere que la magnitud A extraída de la ecuación 10 es sensible a este equilibrio.

Las muestras de proteínas sometidas a mediciones de desnaturalización, cambios de presión y de amontonamiento macromolecular (estabilización de proteínas) producen datos empíricos que sugieren que el efecto de REES, tal como se adapta al modelo en la Ecuación 10, es sensible a los cambios en el equilibrio de los estados conformacionales, por ejemplo, por desplegado (desnaturalización química), estabilización/pegamiento (amontonamiento macromolecular) o perturbación directa (presión). Parece que la magnitud del efecto de REES se puede usar como un sustituto para el paisaje de energía libre de la proteína (FEL), reflejando la distribución de subestados conformacionales discretos.

Basándose en la observación experimental, un marco conceptual para interpretar datos de REES de proteínas usando la Ecuación 10, se muestra en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, algunos aspectos y realizaciones muestran el contenido de información que procede, por ejemplo, de la curvatura de los datos de REES. Dentro de este marco, la curvatura cambiante de los datos de REES, reflejada por la magnitud de A de la ecuación 10, describe la progresión a un número mayor o menor de estados conformacionales discretos, un FEL rugoso o plano, respectivamente.

Además, la intersección con el eje y, R_0 , se puede usar como un indicador de si la muestra de proteína tiende hacia un estado plegado o desplegado, exactamente de la misma manera que se podría esperar de un análisis tradicional de la emisión de Trp en estudios de plegamiento de proteínas, pero con el beneficio añadido de que el modelo numérico de la ecuación 10 ajustado a los datos empíricos tiene en cuenta los casos en los que el pico máximo de la banda de emisión se desplaza con la longitud de onda de excitación. Es importante tener en cuenta que los términos "plegado" y "desplegado" usados en el contexto del marco de la Figura 5 también abarcan más cambios conformacionales menores. Por lo tanto, para proteínas altamente flexibles y dinámicas, un CSM desplazado al azul puede reflejar simplemente un estado conformacional más compacto (como se sugiere en el caso de los resultados del experimento de amontonamiento que se muestran en la Figura 5), sin requerir un evento de plegado a gran escala.

Una vez descritos los principios generales mostrados por algunos aspectos y realizaciones, los experimentos específicos llevados a cabo para demostrar esos principios se exponen con más detalle en los siguientes ejemplos:

Ejemplos

Ejemplo 1: Detalles del planteamiento experimental adoptado para demostrar conexiones entre el efecto de REES y la estructura de la proteína

El modulador esencial de NF- κ B es el elemento regulador clave en la vía de señalización de NF- κ B, que controla gran parte del sistema nervioso e inmunitario [18]. NEMO regula la actividad de una quinasa, I κ B quinasa- β (IKK- β), que tiene un conjunto diverso de objetivos de fosforilación, por ejemplo, I κ B α [19], huntingtina [20] y receptor de insulina 1 (IRS-1) [21]. NEMO supuestamente asegura la especificidad de IKK- β para I κ B α , al facilitar el reclutamiento de I κ B α para la quinasa [19]. La degradación proteosómica posterior de I κ B α después permite que el complejo NF- κ B entre en el núcleo e induzca la expresión de genes proinflamatorios y antiapoptóticos. A pesar de la importancia de NEMO para la salud humana normal y los procesos asociados a la enfermedad, se sabe muy poco sobre el mecanismo de acción molecular de NEMO y, en particular, cómo NEMO puede mostrar especificidad para un gran número de parejas de interacción [22].

Se ha observado que NEMO es una proteína flexible que experimenta un cambio conformacional específico del ligando, y se ha planteado la hipótesis de que la proteína no ligada al ligando adopta un amplio equilibrio de estados conformacionales [23]. La emisión del único resto de Trp intrínseco de NEMO (W6) se ha usado como un indicador espectroscópico de cambio conformacional de NEMO inducido por el ligando [23].

El uso de la espectroscopía de REES se describe para informar sobre los determinantes estructurales y mecanicistas de la unión NEMO-ligando. Primero, se describe un nuevo marco para la interpretación cuantitativa de los datos de REES en estado estacionario, validada por estudios de perturbación de presión y plegamiento. Después esto permite a los autores de la invención usar los datos de REES cuantitativamente para una serie de estados de unión de NEMO-ligando. Se desarrolla un modelo putativo para el mecanismo molecular de las interacciones funcionales de NEMO, la estructura y cómo esto se conecta con el paisaje de energía libre de NEMO y se desarrolla el cambio conformacional.

NEMO W6 muestra una señal de REES significativa.

La Figura 1 muestra la variación en el espectro de emisión (Figura 1A y 1B) y el centro de masas espectral (CSM) (Figura 1B) de NEMO W6 frente a la longitud de onda de excitación. Típicamente, la magnitud del fenómeno de REES en estado estacionario se describe como la diferencia simple en el CSM o $\Delta\lambda_{Em}^{máx}$. A partir de la figura 1, se observa este desplazamiento al rojo significativo en los espectros de emisión, con un aumento en el CSM de 17.7 nm y un aumento en $\Delta\lambda_{Em}^{máx}$ de 15 nm a partir de λ_{ex} 292-310 nm. Esencialmente, los datos se tratan mediante la función lineal:

$$CSM = R\lambda_{ex} + CSM_0 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde R es la magnitud de REES expresada como el cambio en el CSM por nm de la longitud de onda de excitación, λ_{ex} . En este modelo, la intersección en y, CSM_0 , no tiene un significado físico obvio y, típicamente no se da. La línea gris continua en el inserto de la figura 2B muestra el ajuste de los datos de REES de NEMO a la ecuación 1, dando $R = 0.96$.

La señal de REES extraída con NEMO W6 es grande en comparación con otros valores descritos y es todavía más significativa dado que NEMO W6 ya está relativamente expuesto al disolvente. NEMO W6 es un Trp de clase III según la clasificación de Burstein [24]. Típicamente no se cree que los restos de Trp de clase III presenten un efecto de REES significativo [25] debido a la exposición muy significativa al disolvente, dando lugar esencialmente a un solo entorno solvatado. Sin embargo, la espectrina desnaturalizada conserva una firma de REES significativa, a pesar de estar en gran medida expuesta a disolvente [14]. Estos hallazgos se han racionalizado como que reflejan un estado parcialmente "desplegado" con estructura residual, comparable a un estado de glóbulo fundido. Se ha sugerido que NEMO es un glóbulo fundido natural [23] y, por lo tanto, los presentes hallazgos de un efecto de REES muy significativo para un triptófano ya desplazado hacia el rojo son consistentes con los resultados anteriores.

Físicamente, estos hallazgos sugieren que NEMO adopta un equilibrio muy amplio de estados conformacionales, donde hay múltiples entornos de solvatación discretos para W6; esto podría surgir tanto de una serie de microentornos

de W6 así como de la estabilización de diferentes rotámeros del Trp.

Pan et al. han demostrado previamente que incluso los restos de Trp expuestos al disolvente pueden presentar un amplio intervalo de valores de $\Delta\lambda_{Em}^{max}$, que surgen de diferentes rotámeros del Trp [26] y calculan un intervalo de 344 - 365 nm a partir de simulaciones de dinámica molecular para una variedad de péptidos cíclicos. Esto parecería consistente con los datos que muestran un intervalo similar de valores de $\Delta\lambda_{Em}^{max}$. Además, Maglia et al. encuentran un efecto de REES significativo en una sola variante de Trp de DD-carboxipeptidasa atribuible a al menos tres rotámeros del Trp diferentes [27]. Estos rotámeros se pueden estabilizar mediante diferentes enlaces H con el carbonilo de la amida del Trp [28]. Como tal, es difícil separar directamente la contribución de los diferentes rotámeros del Trp y la heterogeneidad conformacional a mayor escala de la cadena principal del péptido a la señal de REES. A continuación, se investiga en detalle la contribución de diferentes rotámeros del Trp a la señal de REES de NEMO.

Podría producirse un efecto de REES artificial si hay una convolución significativa de la señal de Trp con la señal de Tyr de fondo de NEMO. NEMO se excita desde 292 nm hacia arriba específicamente para que no haya esencialmente emisión de la Tyr en relación con la emisión del Trp. Se ha explorado cómo afectaría una señal pequeña de Tyr a los datos de REES controlando los datos de REES para Tyr 10 μ M en solución tamponada y restando esto de los datos de REES de NEMO. Estos datos se muestran en la figura 7. Tener en cuenta la pequeña señal de Tyr que surge de los restos de Tyr intrínsecos de NEMO no da esencialmente ninguna diferencia en los datos de REES. Además, la señal de REES se controla a partir de un solo fragmento que contiene Tyr de la proteína de unión a inmunoglobulina de segunda evasión del complemento de *Staphylococcus aureus* Sbi dominio III y IV que, como NEMO, está compuesta de una fracción significativa de contenido estructuralmente desordenado [29]. Estos datos se muestran en la figura 8. Una señal de REES significativa que procede de la emisión de Tyr no se encuentra como se espera debido a la naturaleza simétrica del sistema de anillo de la Tyr. Juntos, estos datos demuestran que la señal controlada, como se esperaba, procede esencialmente del único Trp intrínseco de NEMO.

Establecimiento de un análisis cuantitativo de datos de REES.

El ajuste de los datos de REES a la ecuación 1 es malo y no tiene en cuenta la curvatura en los datos. Este es el caso de todos los datos de REES de estado estacionario descritos donde se recoge un número significativo de puntos de datos. Para que los datos de REES se usen en estudios comparativos, el R dado en la ecuación 1 será por lo tanto muy inexacto. Para identificar un modelo numérico que se ajuste mejor a estos datos, se mide el cambio en el CSM de la emisión del Trp de NEMO a lo largo de un intervalo extenso de absorción del Trp (mostrado en la figura 2), incorporando el máximo de emisión del Trp. El efecto de REES debe ser observable en el borde al rojo lejano del espectro de absorción, con poco o ningún efecto en el máximo de absorción, ya que la fotoselección y, por lo tanto, REES solo ocurrirá con excitación de energía baja. A partir de la figura 2, esta tendencia es evidente. Es decir, se observa poco o ningún efecto de REES en el máximo del espectro de excitación, pero un efecto de REES significativo en el borde al rojo del espectro. Los cambios observados en el CSM son dominados por el resto de Trp intrínseco de NEMO y no están combinados con contribuciones de emisión de la Tyr, puesto que se ha mostrado antes que, de acuerdo con la teoría, la emisión de Tyr no da un efecto de REES medible y no convolucionan los datos de REES (figura 7). De hecho, se controla la emisión de $\lambda_{Ex} = 292$ nm, donde no hay esencialmente emisión atribuible a la tirosina como se muestra en la Figura S1.

Los datos de REES en la figura 2 se pueden representar mejor por una distribución de probabilidad gaussiana de la forma:

$$f(x) = R_0 + \frac{A\sqrt{2\pi}}{w} \exp\left(-2\left(\frac{x-m}{w}\right)^2\right) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde A es el área, w es la anchura a mitad de altura máxima (fwhm), m es el punto medio y R_0 es la intersección en y , y $m = \lambda_{REES}^{max}$, donde λ_{REES}^{max} es la longitud de onda de excitación que da el cambio mayor en la longitud de onda del máximo de emisión. Los datos de la figura 2 se ajustan a la Ec. 2 e ilustran la excitación de energía baja en el borde al rojo del espectro de absorción de proteínas. El ajuste de la Ec. 2 a los datos experimentales es excelente y captura la relación esperada descrita antes.

Potencialmente, se puede usar la magnitud de A extraída del ajuste de la Ec. 2 a una gráfica de longitud de onda de excitación frente a λ_{Em}^{max} , como un comparador cualitativo para evaluar los cambios en la extensión del fenómeno de REES. La magnitud de R_0 debe representar el valor de λ_{Em}^{max} mínimo, en ausencia del efecto de REES. Esta magnitud se usa habitualmente para reflejar el grado de exposición al disolvente de los restos de Trp y se puede usar como una medida de estados plegados/desplegados. La interpretación de estos valores se describe con más detalle a continuación. Este modelo simple omite claramente una variedad de factores contribuyentes, tales como la proporción de moléculas excitadas, la pequeña contribución de la energía de excitación cambiante a diferentes longitudes de onda de excitación, el número de estados conformacionales discretos que son fotoseleccionables y la contribución de la rotación dipolar en el estado electrónico excitado. Sin embargo, la Ec. 2, a diferencia de la Ec. 1, se basa en un fundamento físico realista y proporciona un medio para extraer datos cuantitativos significativos del conjunto completo de datos de REES. Se pueden usar y se han usado otras funciones de distribución en relación con la extracción de

información de características espectrales, incluyendo distribuciones de Lorentz y log-normal [30-31]. Por último, no se desea tratar de recapitular con precisión el espectro de absorbancia/excitación del fluoróforo, sino que en su lugar se desea tener una sonda físicamente significativa más allá del uso arbitrario de una función lineal simple.

Validación de REES como una sonda cuantitativa de heterogeneidad molecular.

- 5 Habiendo establecido un modelo cuantitativo para comparar los datos de REES, se ensaya la hipótesis de que REES se puede usar para reflejar cambios en el equilibrio de estados conformacionales de las proteínas. Para lograr esto, se controla el efecto de REES con NEMO tanto desnaturalizado como estabilizado, así como con estudios de perturbación de presión que alteran sistemáticamente el equilibrio de los estados conformacionales y los parámetros extraídos del ajuste de los datos se dan en la Tabla 1.

- 10 Tabla 1. Resultados del ajuste de datos de REES del complejo NEMO-ligando a la Ec. 1 y Ec. 2.

	A^a	R_0 (nm)	R^a
Natural, desnaturalizado, amontonado			
NEMO _{natural}	1±0.1	363.2 ± 0.19	1 ± 0.13
NEMO _{desnat}	0.37±0.4	375.0 ± 0.5	0.21 ± 0.01
NEMO + Sbi (20 mg/ml)	2.24 ± 0.51	360.5 ± 0.45	1.07 ± 0.12
Parejas de unión			
NEMO + IκBα	0.85 ± 0.04	364.1 ± 0.62	1.35±0.1
NEMO + NBD-Phe	1.33 ± 0.31	363.0 ± 1.5	0.98 ± 0.1
NEMO + Ub ₄	0.77 ±0.05	364.6 ± 0.77	1.06 ± 0.1
NEMO + Ub ₁₀	1.23 ± 0.0.1	362.8 ± 0.25	0.93±0.11

a, Los valores son relativos respecto al valor extraído para NEMO solo.

- Típicamente no se espera observar un efecto de REES significativo con la proteína desnaturalizada, puesto que la cadena principal peptídica estará completamente accesible al disolvente. En este caso, la relajación del disolvente será muy rápida y no se observará efecto de REES, en efecto porque hay un estado de solvatación discreto (completamente solvatado). NEMO se incubaba en guanidina 6 M para desnaturalizar la proteína y se muestra el cambio correspondiente en el centro de la masas espectral (CSM) frente a λ_{ex} en la figura 3. Se favorece el uso del CSM en lugar de la magnitud de $\Delta\lambda_{Em}^{max}$ ya que esta medición da una señal de REES más robusta y la magnitud $\Delta\lambda_{Em}^{max}$ puede ser muy propensa a errores. Sin embargo, los resultados usando $\Delta\lambda_{Em}^{max}$ son esencialmente los mismos. Una disminución y un desplazamiento hacia el rojo en la emisión del Trp típicamente se correlaciona de manera general con la desnaturalización de las proteínas. De la Figura 3, la incubación con guanidina ha desnaturalizado significativamente NEMO, con un desplazamiento al rojo en el CSM que da $R_0 = 363.2 \pm 0.19$ nm a $R_0 = 375 \pm 0.5$ para la proteína natural y desnaturalizada, respectivamente. Obsérvese que este no es el efecto de REES, sino que refleja la exposición al disolvente de NEMO W6 en la desnaturalización. El NEMO desnaturalizado muestra un efecto de REES notablemente reducido. NEMO desnaturalizado muestra solo un desplazamiento de 4 nm de la λ_{ex} de 292 a 310 nm y el ajuste a la Ec. 1 da $R = 0.22 \pm 0.02$ y una disminución relativa en comparación con NEMO natural de $R = 0.23 \pm 0.1$. El ajuste a la Ec. 2 también produce una gran disminución en el efecto de REES, $A = 0.37 \pm 0.4$. El cambio relativo en el efecto de REES es similar usando cualquiera de los planteamientos y esto indica fuertemente que un planteamiento adecuado usando la Ec. 2 es robusto.

- El amontonamiento macromolecular es una característica clave del medio intracelular que surge de las concentraciones muy altas de otras especies en el citosol. El amontonamiento reduce el disolvente disponible para otras moléculas en solución a través del efecto de volumen excluido, lo cual aumenta efectivamente la concentración de, por ejemplo, proteína y restringe los estados conformacionales accesibles a través de repulsiones de núcleo duro entre el agente de amontonamiento y la proteína. El amontonamiento macromolecular puede alterar la conformación de proteínas, típicamente induciendo plegamiento y estabilización [32]. Por lo tanto, el amontonamiento proporciona potencialmente un medio para explorar el efecto físico de contraste de la desnaturalización en el efecto de REES, donde la proteína está más plegada/estabilizada. Se ha usado una proteína como agente de amontonamiento, la Sbi (descrita antes), en lugar de un agente de amontonamiento sintético, ya que la proteína es mucho más consistente con el entorno intracelular. Sbi carece de cualquier resto intrínseco de Trp y no da lugar a una señal de REES que pueda convolucionar la señal de NEMO (figura 7). La incubación de NEMO con una concentración alta de Sbi (20 mg/ml) produce un cambio notable tanto en la emisión absoluta del Trp como en el efecto de REES como se muestra en la figura 3. La emisión se desplaza al azul ($R_0 = 360.5 \pm 0.45$ nm) en comparación con NEMO en ausencia de Sbi ($R_0 = 363.2 \pm 0.19$) y es más intensa (emisión ~ 1.4 veces mayor), lo que sugiere que el Trp de NEMO está menos expuesto al disolvente y, por lo tanto, que NEMO está más "plegado" en el entorno amontonado. Curiosamente, el efecto de REES es mucho mayor en el entorno amontonado dando un aumento relativo en A de 2.24 ± 0.51 . Por lo tanto, estos datos sugieren que en un entorno amontonado, más similar al medio intracelular, NEMO tiene un FEL rugoso, capaz de explorar una variedad más amplia de estados conformacionales que los observados en la solución tamponada diluida. Esto está de acuerdo con los hallazgos de otros estudios, por ejemplo, Dhar et al., encuentran que la fosfoglicerato quinasa muestra un aumento en el muestreo conformacional en un entorno amontonado [32]. Esto está de acuerdo con el modelo molecular putativo de la actividad de NEMO que se basa en el cambio conformacional de NEMO regulado alostéricamente. A continuación, se describe el posible papel mecanístico de un mayor número de

estados conformacionales disponibles con respecto a las interacciones del ligando.

Basándose en el análisis de proteínas naturales, desnaturalizadas y estabilizadas (figura 3), así como en la base teórica del efecto de REES, la magnitud de REES debería ser sensible a los cambios en el número de estados conformacionales en equilibrio discretos. Ensayar esto es un reto ya que pocos planteamientos experimentales dan una ventana directa al equilibrio de los estados conformacionales. La perturbación de la presión no desnaturalizante es una herramienta excelente para este propósito, ya que actúa para perturbar un equilibrio preexistente de estados estructurales caracterizados por diferentes mínimos de energía en el FEL de la proteína [33] y se ha usado para este propósito en una serie de estudios [34-36]. Básicamente la presión, a diferencia de la temperatura, no altera la energía interna del sistema, que de otro modo podría ser un factor de confusión para las mediciones de REES. La observación de una dependencia significativa de la presión sobre el propio efecto de REES sería, por lo tanto, una prueba poderosa de que REES es sensible al equilibrio de los estados conformacionales de las proteínas.

Previamente se descubrió que el aumento de presión causa una disminución en la emisión de W6, lo que sugiere una mayor exposición al disolvente [23]. Este hallazgo está corroborado por un desplazamiento hacia el rojo en el CSM de W6 con el aumento de presión (figura 3A), dando un aumento de 3.0 nm a $\lambda_{ex} = 292$ nm. El valor del CSM es bastante mayor que el comunicado para el estudio de desnaturalización anterior (figura 3A y 3B) y esto se debe a una ventana espectral diferente usada para calcular el CSM para los estudios de presión. Esto fue necesario debido a la configuración óptica de la celda de presión. El valor $\Delta\lambda_{Em}^{max}$ de W6 a 1 bar es similar al descrito antes, dando $\Delta\lambda_{Em}^{max} = 348$ nm a 10°C, 1 bar y $\lambda_{ex} = 295$ nm. El aumento de la presión conduce a un CSM grande a valores más altos de λ_{ex} , dando un aumento de 8.9 nm a $\lambda_{ex} = 310$ nm de 1 a 2000 bar. Estos datos sugieren que el propio efecto de REES depende de la presión. El ajuste de los datos de REES a la Ec. 4 da la dependencia de la presión de A, mostrado en la figura 4D como el cambio en la fracción de A a lo largo del intervalo de presión. No se observa efecto de REES con Trp libre en solución tamponada a ninguna presión (figura 9) y los cambios observados son específicos de la proteína. Los datos de dependencia de la presión se pueden ajustar adecuadamente a un modelo fenomenológico simple que implica una sola transición entre dos estados con presión hidrostática cambiante como se ha usado anteriormente [23,38]:

$$\frac{A_i(p, T)}{\sum_j A_j(p, T)} = \frac{K_i(p, T)}{1 + K_i(p, T)} = \frac{\exp(\ln K_0 - \Delta V_i^\ddagger / R_p T)}{1 + \exp(\ln K_0 - \Delta V_i^\ddagger / R_p T)} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde $R_p = 83.13 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ bar K}^{-1}$ cuando la presión, p , se mide en bar, K_0 es la constante de equilibrio para el cambio en la población relativa del estado conformacional i -ésimo representado por la magnitud A de la Ec. 4, extrapolada a 0 bar y ΔV_i^\ddagger es la diferencia aparente en el volumen asociado con esta transición de equilibrio.

Al ajustar los datos en la figura 4 a la Ec. 3 se obtiene un volumen de activación negativo $\Delta V = -24.7 \pm 4.7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

Se ha medido ΔV para la emisión de W6 y se encuentra (como se muestra aquí) que la emisión disminuye a lo largo del intervalo de presión dando $\Delta V = 0.81 \pm 0.03 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ [23]. La diferencia en el signo es atribuible simplemente al cambio relativo en la dirección de la señal específica. Lo que es importante es que la magnitud de ΔV es mucho mayor para el efecto de REES en comparación con la emisión de W6. De hecho, esta magnitud de dependencia de la presión es más consistente con las mediciones globales del cambio conformacional de NEMO medido previamente usando la dependencia de la presión de la emisión de 8-anilino-naftalenosulfonato (ANS) [23]. Por lo tanto, la señal de REES puede ser reflejo del equilibrio más amplio de los estados conformacionales de NEMO en sitios distales a W6. Es decir, estos dos valores no son necesariamente comparables, ya que reflejan diferentes aspectos del entorno molecular de W6. El hallazgo clave de los datos de presión en el presente contexto es que el propio efecto de REES depende de la presión con la magnitud A que aumenta con la presión. Dado que la presión actúa para perturbar el equilibrio de los estados conformacionales, esta observación sugiere que la magnitud A extraída de la Ec. 2 es extremadamente sensible a este equilibrio.

Los hallazgos de las mediciones de desnaturalización, presión y amontonamiento macromolecular sugieren que el efecto de REES modelizado por la Ec. 2 es sensible a los cambios en el equilibrio de los estados conformacionales, p. ej. por desplegado (desnaturalización química), estabilización/plegamiento (amontonamiento macromolecular) o perturbación directa (presión). Como tal, se sugiere que la magnitud del efecto de REES se puede usar como un sustituto para el paisaje de energía libre (FEL) de proteínas, reflejando la distribución de subestados conformacionales discretos. Basándose en las observaciones, se desarrolla un marco conceptual para interpretar los datos de REES de proteínas usando la Ec. 2, mostrada en la figura 5. La interpretación de los datos presentes va más allá de las aplicaciones actuales al reconocer explícitamente el contenido de información que surge de la curvatura de los datos de REES. Dentro de este marco, la curvatura cambiante de los datos de REES, reflejada por la magnitud A de la Ec. 2, describe la progresión a un número mayor o menor de estados conformacionales discretos, un FEL rugoso o plano, respectivamente. Además, la intersección con el eje y, R_0 , describe si la proteína tiende hacia un estado plegado o desplegado, exactamente de la misma manera que en el análisis normal de la emisión de Trp en estudios de plegamiento de proteínas, pero con el beneficio añadido de que tiene en cuenta los casos en que el máximo del pico de la banda de emisión se desplaza con la longitud de onda de excitación. Es importante observar que los términos plegado y desplegado abarcan también más cambios conformacionales menores. Así, para proteínas altamente flexibles y dinámicas, un CSM desplazado al azul puede reflejar simplemente un estado conformacional más compacto

(como se sugiere en el caso del experimento de amontonamiento que se muestra en la figura 2), sin requerir un suceso de plegado a gran escala.

Es importante reconocer que los datos de REES de los restos de Trp de las proteínas estarán convolucionados con la señal que procede de diferentes rotámeros del Trp [26]. Sin embargo, las observaciones sugieren que, al menos para NEMO, la señal de REES no está significativamente convolucionada con una señal de los rotámeros del Trp. Es decir, la dependencia de la presión del REES da un volumen de activación muy grande ($-24.7 \pm 4.7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), mucho mayor que el basado en la emisión de Trp solo ($-1.6 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) y más consistente con mediciones que reflejan el cambio conformacional global de NEMO [23]. Además, se demuestra a continuación que la unión del ligando en sitios que no se encuentran cerca del resto de Trp altera significativamente la señal de REES y esto es una prueba poderosa de que la señal de REES de NEMO está dominada por el conjunto estructural global de las proteínas.

Nueva comprensión a partir de REES de la naturaleza del cambio conformacional inducido por el ligando y el alosterismo de NEMO.

Habiendo establecido que el efecto de REES, específicamente el uso de la Ec. 2, se puede usar como un sustituto para el paisaje de energía libre de proteínas, se considera cómo la señal de REES de NEMO varía tras la unión del ligando. Estos datos deberían dar una comprensión más directa del mecanismo del cambio conformacional inducido por el ligando y la relación con el FEL de la proteína. Los datos de REES para los estados unidos al ligando de NEMO se muestran en la figura 6A y 6B con las líneas continuas que representan el ajuste a la Ec. 2. Los valores extraídos resultantes de A de la Ec. 2 se dan en la Tabla 1 y también como un gráfico de barras insertado en la figura 6. Para mayor claridad, se da el cambio relativo en R y A en comparación con NEMO solo, extraído de la Ec. 1 y Ec. 2, respectivamente.

La Figura 6A muestra NEMO solo y unido a un peptidomimético de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ o $\text{IKK-}\beta$. El péptido $\text{IKK}\beta$ (denominado el dominio de unión a NEMO, NBD) contiene dos restos de Trp y, por lo tanto, no es adecuado para el presente estudio, ya que la señal del péptido confundiría el análisis del Trp único de NEMO. En cambio, estos restos de Trp se sustituyen por un aminoácido conservador, Phe, y se llama NBD-Phe. Se encuentra que este péptido modificado se une a NEMO, dando una disminución en la emisión de W6 de $\sim 50\%$. A partir de la tabla 1 y la figura 5A hay una diferencia significativa en la magnitud A dependiendo de la forma de ligando unida a NEMO. Es decir, A disminuye significativamente en la unión del péptido $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($A = 0.85 \pm 0.04$) pero aumenta significativamente en la unión de NBD-Phe ($A = 1.33 \pm 0.3$). Si los datos de unión al ligando mostrados en la figura 5A se ajustan a la función lineal simple descrita por la Ec. 1, se encuentra una tendencia diferente. Es decir, a partir de la Ec. 3, la unión del péptido $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ aumenta la magnitud relativa del efecto de REES ($R = 1.35 \pm 0.1$) y la unión del péptido $\text{IKK-}\beta$ no produce cambios esencialmente en la magnitud relativa del efecto de REES ($R = 0.98 \pm 0.1$). A partir de la figura 6A es evidente que los datos de REES no son equivalentes con NEMO unido a NBD-Phe y NEMO solo como lo sugiere el ajuste a la Ec. 1. Por el contrario, la principal diferencia está en la curvatura de los datos y esto se captura usando la Ec. 2. Basándose en estos hallazgos de los datos de presión descritos anteriormente, se sugiere que estos datos reflejan una disminución en el número de estados conformacionales discretos en la unión a $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, pero un aumento en el número de estados conformacionales discretos en la unión de $\text{IKK-}\beta$. Esta relación de oposición está respaldada por los estudios previos de unión ligando-NEMO que controlan el cambio en la emisión de ANS [23], lo que sugieren la exposición de restos hidrófobos en la unión de IKK y el enterramiento de restos hidrófobos en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

NEMO comprende un dominio específico que se une de forma no covalente a poliubiquitina. Anteriormente, se había encontrado que la unión de cadenas de poliubiquitina ligadas a M1 "libres" de longitud de cadena larga a NEMO regula de manera alostérica la afinidad del ligando y potencialmente la localización celular basándose en la evidencia de los ensayos de flujo detenido y unión a liposomas [23]. La poliubiquitina se encuentra como una variedad de longitudes de cadena en la célula y previamente a partir de estudios de unión de ANS se ha proporcionado evidencia de que NEMO experimenta un cambio conformacional diferente dependiendo de la longitud de la cadena de la poliubiquitina unida no covalentemente [23]. El efecto de REES en NEMO W6 se explora tanto en presencia de cadenas de poliubiquitina cortas (4-mero; Ub_4) como largas (10-mero; Ub_{10}), como se muestra en la Figura 6B. A partir de los valores resultantes de A , dados en la Tabla 1, la unión de Ub_4 da una disminución de A ($A = 0.77 \pm 0.05$), pero Ub_{10} da un aumento ($A = 1.23 \pm 0.1$). Un ajuste lineal simple a la Ec. 1 sugiere que no hay diferencia en REES con cualquiera de las longitudes de cadena dando A de ~ 1 dentro del error (Tabla 1), a pesar de las diferencias obvias en la curvatura de los conjuntos de datos. La magnitud absoluta de la diferencia de REES es pequeña. Se observa una tendencia amplia que potencialmente sugiere que las longitudes de cadena más largas inducen una variedad más amplia de estados conformacionales de NEMO accesibles.

Basándose en el modelo estructural de NEMO más actual, el sitio de unión de la poliubiquitina no se encuentra cerca del resto de Trp natural [23,37]. Que se observe un cambio significativo en el efecto de REES para este Trp es consistente con la noción de que la unión de poliubiquitina altera la conformación o dinámica de NEMO de manera alostérica. La tendencia a una disminución en REES con longitudes de cadena de poliubiquitina más cortas y un aumento con longitudes de cadena más largas refleja la unión de ANS que se ha descrito previamente [23]. Es decir, se observa una disminución en la emisión de ANS (lo que sugiere enterramiento de restos hidrófobos) en longitudes de cadena cortas y un aumento (lo que sugiere la exposición de restos hidrófobos) en longitudes de cadena más largas. Combinados, estos datos sugieren que las longitudes de cadena de la poliubiquitina más cortas pueden

conducir a compactación (enterramiento de hidrófobos y una reducción en el equilibrio de estados conformacionales) y longitudes de cadena más largas pueden conducir a la expansión (exposición de hidrófobos y un mayor equilibrio de estados conformacionales) de NEMO. Los datos de REES sugieren además que estos cambios no son sucesos de plegamiento o desplegado a gran escala ya que los valores de R_0 (Tabla 1) son esencialmente los mismos. Basándose en estos datos, se cree que, sin estar limitado por ninguna teoría en particular, la regulación alostérica de NEMO por la poliubiquitina se produce al modular el equilibrio de los estados conformacionales disponibles, en lugar de un cambio estructural bruto.

Hay un gran interés contemporáneo en la relación entre el equilibrio de los estados conformacionales de las proteínas naturales y cómo cambia este equilibrio con la unión del ligando [38-41]. Basándose en el entendimiento a partir de los datos actuales, se sugiere que NEMO usa predominantemente un modelo de selección conformacional de unión al ligando. Es decir, NEMO adopta una variedad de estados conformacionales equilibrados representados por mínimos energéticos discretos en el FEL de la proteína. La unión al ligando se produce en uno de estos conformeros previamente existentes, desplazando el equilibrio hacia la población unida al ligando.

Por ejemplo, como se ha mostrado antes, la unión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ da una reducción significativa en el número de conformeros de NEMO, lo que implica un FEL menos rugoso para el complejo binario. Sin embargo, este modelo podría extenderse para sugerir que la unión del ligando también puede inducir nuevos estados conformacionales, así como expandir el número de estados discretos dentro de la población (un FEL más rugoso) como con NBD y Ub_{10} . Un posible fundamento mecanístico para este hallazgo es que el nuevo espacio conformacional permite nuevas interacciones moleculares, no accesibles a la proteína sola no unida al ligando. De hecho, Ub_{10} aumenta la afinidad de NEMO por $\text{IKK-}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y promueve la asociación de liposomas [23]. Basándose en los datos actuales, se cree que, sin estar sujeto a ninguna teoría particular, este efecto alostérico se logra por exposición de nuevos sitios de unión de alta afinidad o determinantes de unión adicionales para estas especies.

Un estudio reciente de Bagnérís et al. [37] ha modelizado la estructura de NEMO como una doble espiral paralela y ha proporcionado evidencia experimental para este modelo estructural por PELDOR (estudios de doble resonancia electrónica pulsada). Previamente se ha encontrado a partir de estudios de CD de UV lejano que NEMO está compuesto principalmente de α -hélice (~50%) y espiral aleatoria (~40%) y los datos presentes sugieren que la estructura de NEMO ocupa un equilibrio de estados conformacionales. Estos datos se pueden resolver por un modelo en el que NEMO se encuentra en un equilibrio dinámico entre estados bien plegados (doble espiral) y localmente desplegados (espiral aleatoria). Este equilibrio dinámico se puede entonces estabilizar de manera diferente en la unión del ligando, dando lugar con $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ a una mayor proporción de contenido plegado y dando $\text{IKK-}\beta$ /poliubiquitina más contenido no estructurado. Este modelo sería entonces consistente con los datos de PELDOR, los estudios de unión de ANS y los presentes datos de REES.

Métodos

Expresión y purificación de proteína.

NEMO humana de longitud completa se expresó y purificó esencialmente como se ha descrito previamente [23]. La proteína purificada se dializó extensamente en un tampón que comprende Tris-Cl 50 mM a pH 8.0, NaCl 50 mM y DTT 5 mM. Todas las mediciones se hicieron en este tampón a menos que se indique lo contrario. Los péptidos $\text{IKK-}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fueron sintetizados comercialmente por Genscript, con una pureza de >98% y tienen la secuencia TALDFSFLQTE y DDRHDSGLDSMKD, respectivamente. El péptido $\text{IKK-}\beta$ se modificó de manera que los dos restos de Trp naturales se sustituyeron por restos de Phe. La poliubiquitina unida a M1 se adquirió de Viva Bioscience. El fragmento de proteína inmunomoduladora de *Staphylococcus aureus* Sbi-III-IV K173A se expresó y purificó esencialmente como se ha descrito previamente [44]. La concentración de proteína usada era entre 1 y 5 μM . Las concentraciones de péptidos eran 1 mM y las concentraciones de poliubiquitina eran 1 μM .

Excitación de borde al rojo y mediciones de alta presión

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS50B (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) conectado a un baño de agua circulante para la regulación de la temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$). Las muestras se incubaron durante 5 minutos en las condiciones dadas antes de registrar las mediciones. Las mediciones se realizaron a 10°C , a menos que se indique lo contrario. Las anchuras de las rejillas de excitación y emisión eran de 5 nm, excepto para los experimentos de presión donde eran de 10 nm. Se requería una anchura mayor de la rejilla debido a la configuración óptica de la celda de presión para garantizar una relación de señal a ruido baja para la señal de emisión W6. Para los barridos de excitación de borde al rojo de NEMO, se controló la emisión de triptófano de 315 a 550 nm. La longitud de onda de excitación posteriormente se aumentó en pasos de 1 nm para un total de 19 barridos. Para los barridos de excitación de borde al rojo de Sbi-III-IV, la emisión de la tirosina se controló de 294 a 400 nm, con la longitud de onda de excitación ajustada a 274 nm. Del mismo modo, la longitud de onda de excitación posteriormente se aumentó en pasos de 1 nm para un total de 19 barridos. El tampón o el control de tampón y ligando correspondiente se restó de los espectros para cada condición experimental. Específicamente, para el experimento de amontonamiento con Sbi, la emisión se resta del Sbi, de modo que la señal no se convoluciona con la emisión de la Tyr de Sbi de ninguna manera.

Se usó una celda de alta presión ISS (ISS, Champaign, UL, EE.UU.), equipada con un montaje de fibra óptica personalizado en el fluorímetro y conectada a un baño de agua circulante para la regulación de la temperatura para registrar todas las mediciones de alta presión. Para las mediciones de excitación de borde al rojo de alta presión de NEMO, se controló la emisión del triptófano entre 325-450 nm.

5 El centro de masa espectral (CSM) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$CSM = \frac{\int \lambda_{em} I(\lambda) d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda} \quad \text{Ec. 4}$$

10 Donde f_i es la intensidad de la fluorescencia medida y λ_{em} es la longitud de onda de emisión. Se destaca la importancia de usar un intervalo de longitud de onda consistente cuando se dan los datos de CSM, ya que la magnitud dependerá del intervalo de longitud de onda elegido. Así pues, se da el CSM a lo largo del intervalo de emisión 325-450 nm o 335-450 nm para experimentos de presión.

Ejemplo 2: Se muestra la conformación y estabilidad de la proteína usando una interpretación cuantitativa del desplazamiento de borde biomolecular

15 Usando un panel de mAb terapéuticos, se demuestra que la sensibilidad de este planteamiento se puede usar para discernir entre anticuerpos estructuralmente idénticos, cuantificar estados naturales y desplegados, detectar la formación de agregados solubles en la etapa más temprana y, lo más importante, se puede usar para predecir la estabilidad termodinámica. Esta herramienta tendrá un uso inmediato para hacer formulaciones biofarmacéuticas estables y podría reducir significativamente el coste del procedimiento de desarrollo de fármacos. Está demostrado que el planteamiento no solo es capaz de seguir la progresión hacia estados desplegados y agregados de forma independiente, sino que también se puede usar en una capacidad predicativa para inferir la estabilidad termodinámica.

20 Los hallazgos demuestran que la presente descripción proporciona una herramienta simple y poderosa para controlar el estado conformacional de las proteínas y abre la puerta a que este planteamiento sea adoptado ampliamente como parte del procedimiento de garantía de calidad comercial, formulación de productos biofarmacéuticos y uso en laboratorios académicos.

QUBES da un perfil dinámico de las proteínas.

25 Se han vigilado los efectos de desplazamiento de borde para una variedad de mAb y se muestran en la figura 13 A-C. Primero, se vigila el espectro combinado de excitación y emisión para cada mAb, dando un conjunto de datos de fluorescencia de alto contenido de información (figura 13A). La intensidad y la posición del pico de la emisión incorporan información sobre (i) el número de restos de Trp en la muestra, (ii) el grado de exposición al disolvente de los restos de Trp²⁴, incluyendo los que proceden de diferentes rotámeros, (iii) transferencia de energía a la cadena principal del péptido⁴², homotransferencia a otros restos de Trp⁴³, y (iv) fotoselección de entornos de solvatación discretos con excitación de baja energía.⁴⁴ Las contribuciones de la emisión de Tyr son esencialmente insignificantes a lo largo del intervalo de excitación usado.²⁴ A partir de estos datos (figura 13A) se puede extraer la variación en los espectros de emisión con la longitud de onda de excitación como el cambio en la posición del pico de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}$) o como el cambio en el centro de la masa espectral (CSM). Se prefiere el uso de CSM, ya que no requiere el ajuste del modelo para extraer con precisión el máximo del pico de emisión e incorpora información de todo el conjunto de datos.

35 La Figura 13B muestra un ejemplo de la gráfica resultante de CSM frente a la longitud de onda de excitación para un mAb de ejemplo. Estos datos muestran una curvatura marcada, similar a lo descrito con proteínas que contienen restos de Trp individuales.²⁴ El ajuste lineal simple de estos datos es claramente inadecuado para capturar el contenido completo de la información contenida en el conjunto de datos. Se ha ajustado una distribución gaussiana a estos datos para capturar la información contenida en la curvatura de los datos de desplazamiento de borde.²⁴ Este planteamiento tiende a llevar a valores de error relativamente grandes, ya que el modelo contiene un gran número de parámetros variables. Se ajusta una función exponencial más simple,

$$CSM = CSM_0 + A e^{-R\lambda_{Ex}} \quad \text{Ec. 1}$$

45 Donde CSM_0 es el valor del CSM independiente de la longitud de onda de excitación, λ_{Ex} , determinado por la amplitud, A , de un exponencial con una curvatura determinada por R . El ajuste con esta función en lugar de una distribución de probabilidad gaussiana u otra mejora notablemente la velocidad del procesamiento de datos debido a la menor dimensionalidad del modelo, pero todavía conserva los aspectos clave del modelo anterior, en concreto, la cuantificación de la magnitud del desplazamiento de borde de fluorescencia. La gráfica de los parámetros resultantes da un único punto de datos tridimensional (figura 13B, inserto; el valor de QUBES), que es una cuantificación directa de la huella espectral extremadamente compleja que se muestra en la figura 13A.

55 Se miden los valores de QUBES para una variedad de mAb terapéuticos de diferentes clases que incluyen quiméricos (ximab), humanizados (zumab) y humanos (lumab) en el mismo sistema tampón. Los mAb humanizados se muestran en la figura 31C y todos los ejemplos en la figura 13D. Hay una diferencia muy significativa en el valor de QUBES para cada uno de los mAb estudiados y entre las clases de mAb. Es decir, los mAb humanizados presentan una agrupación completamente separada de valores de QUBES para mAb humanizados. Los valores individuales de QUBES son extremadamente reproducibles tanto para repeticiones individuales de la misma muestra como para variación de lote

a lote, con una desviación estándar típica de ~20% para A , ~10% para R y <1% para CSM_0 . Así pues, las diferencias en la Figura 13C son de buena fe y no representan la varianza absoluta a lo largo de las muestras en su conjunto.

La separación de los valores de QUBES (Figura 13D) es extremadamente sorprendente dada la muy alta conservación de secuencia de los mAb y la similitud estructural general de la región Fab donde se encuentra la mayor variabilidad. Nueve de los doce ejemplos estudiados son del isotipo IgG1, excepto pembrolizumab, vedolizumab y natalizumab, que son IgG4, que se diferencian solo por tres restos en la región bisagra y que retienen los mismos enlaces disulfuro entre cadenas pesadas. Para la misma clase de mAb (quimérico, humanizado o humano), se puede considerar que las estructuras tridimensionales son esencialmente idénticas. De hecho, el espectro de dicroísmo circular de UV lejano y el perfil de dispersión dinámica de luz (DLS) de estos mAb de longitud completa es muy similar, si no idéntico (véase más abajo) como se espera para proteínas con alta similitud de secuencia y estructuras generales similares, en particular en el porcentaje de contenido de estructura secundaria. La región Fab (figura 18) contiene la mayor variabilidad de secuencia y hay algunas pequeñas diferencias en el número y/o posición de los restos de Trp para algunos de los mAb en la región Fab (figura 18 y 18B y tabla de la figura 21). Sin embargo, estas diferencias (número de restos y área superficial accesible al disolvente) no se correlacionan, muestran una correlación con los valores de QUBES extraídos (figura 18C y 18D). Se ha sugerido previamente que la curvatura en el efecto de REES captura información sobre el equilibrio de los estados conformacionales accesibles en el FEL, que se puede considerar como la rigidez/flexibilidad relativa de las proteínas y se cree que esto es al menos parte del origen de la sensibilidad de detección de la cuantificación de la curvatura en datos de REES.

QUBES detecta y cuantifica el desplegado y la agregación de proteínas.

Los cambios en la estructura de la proteína están acompañados por un cambio en el equilibrio de los estados conformacionales. Se ha encontrado previamente con un sistema modelo, una proteína "hub" (descrita antes), que al cuantificar la curvatura en los datos de REES es posible capturar información sobre estados desplegados y el cambio conformacional inducido por el ligando. Se exploró si la detección sensible de diferencias en los datos de REES podría ser útil para detectar cambios sutiles en la estructura de la proteína en los mAb. Se ensaya si los datos de QUBES se pueden usar para identificar el desplegado y la agregación de los mAb, ya que estos son problemas clave a los que se enfrenta el desarrollo de productos biofarmacéuticos. La figura 14A muestra los datos de QUBES para mAb incubados en urea 8 M y desnaturalizados térmicamente, respectivamente. La incubación con urea hará que los mAb se desplieguen parcialmente (reteniendo los enlaces disulfuro naturales), pero también evitará la formación de agregados, mientras que la desnaturalización térmica, particularmente para los mAb estudiados, conduce directamente a la formación de agregados. La formación de agregados solubles se vigila en los mAb desnaturalizados térmicamente por dispersión dinámica de luz (DLS), mostrada en la figura 19.

La figura 14A muestra que los mAb desplegados (desnaturalizados con urea) se agrupan para valores de CSM_0 y R más altos, pero valores de A más pequeños. Estos datos reflejan un efecto de REES más plano de una magnitud total menor basada en un ajuste lineal simple. Basándose en los resultados de los estudios de proteínas modelo del efecto de REES,²⁴ estos datos pueden reflejar restos de Trp más expuestos al disolvente (indicados por el CSM_0 más alto) y una disminución en la variedad de estados conformacionales disponibles para la proteína. Estas nociones están en línea con la variedad de proteínas que se ha observado que tienen un efecto de REES menor tras desplegado, lo que refleja la transición hacia un equilibrio restringido de estados conformacionales caracterizados por una proteína completamente desplegada.^{45,15,13} Por el contrario, al tratar las tendencias brutas en todo el conjunto de datos (figura 14A), se encuentra que los mAb desnaturalizados térmicamente se agrupan para valores de A elevados, pero valores de R y CSM_0 similares (estos cambios se exploran en más profundidad a continuación). Basándose en los datos de DLS correspondientes (figura 18), el aumento en la magnitud de A parecería, por lo tanto, reflejar predominantemente la formación de agregados solubles. El valor de QUBES no solo es capaz de discernir las proteínas nativas y desnaturalizadas, sino también de separar las proteínas que están desplegadas de las que se agregan.

La variación observada en los valores de QUBES para los mAb desnaturalizados (figura 14A) puede reflejar el grado diferente de desplegado o agregación para cada una de las muestras y la naturaleza específica de los estados desplegados o agregados. Esto se confirma vigilando el desplegado secuencial de Tocilizumab y la agregación de Rituximab mostrada en la figura 14B y 14C, respectivamente. El desplegado de Tocilizumab procede con un desplazamiento inicial en el valor de QUBES a un valor de R más grande y A más pequeño (figura 14B). Este hallazgo es consistente con otros estudios que describen un desplazamiento de borde general más pequeño para la proteína desplegada frente a la natural, ya que la proteína tiende hacia un solo estado conformacional; desplegado.^{45, 25, 13} Solo en concentraciones más altas de urea (7 M) hay un aumento significativo en el valor de CSM_0 observado. Un aumento en el CSM_0 podría indicar más restos de Trp expuestos al disolvente indicativo del desplegado de la proteína.²⁴ El cambio en el CSM_0 o mediciones relacionadas, tal como la relación de emisión 350:330 nm o el máximo de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}$), se usan habitualmente para evaluar el desplegado de la proteína, ya que refleja potencialmente cambios en la estructura terciaria de la proteína. Por lo tanto, los datos ilustran que estas mediciones ignoran los cambios en la etapa temprana de la estructura de la proteína que no son capturados por simples mediciones de emisión de fluorescencia en estado estacionario.

Con el fin de vigilar el gradiente del efecto de la agregación de mAb, se titula una muestra de Rituximab agregado (solo agregados solubles) en una muestra no agregada y los valores de QUBES resultantes se muestran en la figura 14C. Se observa una tendencia esencialmente lineal en el valor de QUBES con respecto a una proporción creciente

de agregado soluble, que se pone de manifiesto como una disminución en la magnitud de R y CSM_0 y un aumento en A . El valor de CSM_0 decreciente puede reflejar que los restos de Trp están más enterrados en la proteína agregada. Los valores de QUBES muestran un desplazamiento significativo (fuera del error de los valores medidos) en concentraciones tan bajas como 5% de agregado soluble.

- 5 Se proporciona prueba adicional de esta tendencia calculando el cambio esperado en los datos por modelización numérica de una fracción creciente de mAb desplegado y agregado mostrado en la figura 14D y figura 20. Este planteamiento tiene la ventaja de que no se trata de volver a plegar o desagregar. Los valores de la modelización se generan aumentando la contribución fraccionaria del espectro desplegado/agregado al espectro de proteína natural y realizando el análisis de QUBES en los espectros resultantes. Similar a la tendencia en la figura 14C, hay una variación esencialmente lineal en el valor de QUBES para fracciones crecientes de proteína desplegada/agregada, donde el valor de A se representa en una escala logarítmica como se muestra en la figura 20. Esto significa que se puede producir fácilmente una curva de calibración para estimar la fracción de material desplegado o agregado en una muestra simplemente midiendo los valores de QUBES para la proteína desnaturalizada natural y completa.

- 15 La presencia de agregados de proteínas es uno de los criterios clave en la garantía y control de calidad biofarmacéutica y, típicamente, se vigila usando planteamientos de dispersión de la luz tales como DLS. Para este fin, se vigila una evolución temporal de la agregación térmica de Nivolumab tanto por QUBES como por DLS y los datos se muestran en la figura 15A y 15B-E, respectivamente. Se observa un aumento en A y una disminución en R y CSM_0 , correlacionado con el aumento de la formación creciente de agregados solubles. Tanto los datos de QUBES como de DLS muestran un desplazamiento significativo a 1 h de incubación (figura 15B). Los valores de QUBES muestran un desplazamiento significativo antes de un cambio en los datos de volumen de DLS (figura 15B y 15C) e incluso donde solo hay cambios sutiles en los datos de intensidad (figura 15D). Los perfiles de intensidad de DLS son mucho más sensibles que los perfiles de volumen de DLS, pero típicamente se prefieren los datos de volumen ya que pueden ser potencialmente cuantitativos y a menudo sufren falsos positivos. Dado que el valor de QUBES muestra un desplazamiento significativo antes de un cambio en el volumen de los perfiles de DLS, el valor de QUBES se puede usar para cuantificar el porcentaje de agregados solubles con detección que es al menos tan sensible y precisa como la DLS.

- 25 En resumen, el planteamiento de QUBES debería ser extremadamente sensible al cambio de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de proteínas. Esto puede deberse a que captura información sobre cambios sutiles en el equilibrio de los estados conformacionales de las proteínas. Los datos corroboran esto, demostrando que el valor de QUBES es sensible y puede cuantificar las fracciones crecientes de especies desplegadas o agregadas con una sensibilidad muy alta.

Uso de QUBES como herramienta predictiva y para la formulación de productos terapéuticos.

- 35 Dada la extrema sensibilidad del planteamiento de QUBES para detectar y cuantificar por separado tanto el desplegado como la formación de agregados solubles, el planteamiento puede encontrar la mejor utilidad en la predicción y formulación de preparaciones biofarmacéuticas estables. La cuantificación de la curvatura en los datos de REES podría reflejar información sobre la flexibilidad de la proteína (véase más abajo). La mayor flexibilidad de las proteínas típicamente se correlaciona con una menor estabilidad termodinámica porque hay una barrera energética más pequeña de desplegado como se pone de manifiesto de una variedad de estudios de enzimas mesófilas frente a termófilas.⁴⁶ Los mAb que se predice que son relativamente rígidos (valor de A pequeño y R alto), p. ej. Pertuzumab pueden ser más estables que los que se predice que son relativamente flexibles (valor de A alto y R pequeño), p. ej. Nivolumab. Se ha explorado la estabilidad térmica de tres mAb con valores de QUBES que sugieren una mayor flexibilidad (Pertuzumab, Vedolizumab y Nivolumab), vigilando la formación de agregados solubles a la misma temperatura para cada mAb, como se muestra en la figura 16A. Basándose en los valores de QUBES y los perfiles de DLS correspondientes (figura 16B), existe una tendencia a una fracción más significativa de agregados solubles presente para Nivolumab en comparación con Vedolizumab en comparación con Pertuzumab. Por lo tanto, estos datos confirman que el valor de QUBES se puede usar de manera predictiva para inferir la estabilidad termodinámica relativa de una muestra. El poder predictivo solo es adecuado para la misma muestra, ya que cada proteína presentará una firma específica de QUBES. En el presente caso, los mAb tienen estructuras tridimensionales que son esencialmente idénticas, por lo que la comparación entre ellas es válida.

- 50 Se ha determinado el poder del planteamiento de QUBES para la formulación de preparaciones biofarmacéuticas estables. Con ese fin, se ha vigilado el desplegado y la agregación inducidos por la temperatura de Pembrolizumab tanto en presencia como en ausencia de un adyuvante conocido (glucosa) y los valores de QUBES resultantes y los perfiles de DLS se muestran en la figura 16C y 16D, respectivamente. La incubación de Pembrolizumab a 37°C durante 5 días induce la formación significativa de agregados solubles. Sin embargo, basándose en la detección con el planteamiento de QUBES, la glucosa proporciona una protección significativa frente a la formación de agregados con un menor porcentaje de formación de agregados solubles evaluado tanto por el valor de QUBES como por los perfiles de DLS (figura 15D y 15E). De hecho, el valor de QUBES para la muestra que contiene glucosa se desplaza a un valor de A pequeño y de R alto, lo cual es indicativo de una proteína más estable (descrita antes). Se encuentra un resultado similar para Vedolizumab como se muestra en la figura 20 usando tiempos de incubación incluso más cortos. No se observa ninguna modificación postraduccional de los mAb (glicación) basado en un sistema indicador de fluorescencia⁴⁷ y, por lo tanto, el efecto se debe a la estabilización de los mAb y no a un artefacto derivado de la

glicación.

Conclusiones

Por vigilar experimental una gran cantidad de mAb, se proporciona un esquema robusto para la interpretación del valor de QUBES como se muestra en la figura 17. Usando QUBES se puede detectar con precisión, separar y cuantificar tanto el desplegado de proteínas como la formación en etapa temprana de agregados solubles, así como un predictor de la estabilidad de la muestra. QUBES es mejor que los planteamientos que se usan habitualmente en este momento. El análisis de QUBES tiene las ventajas de que: (i) la adquisición y el análisis de datos es rápido (<5 min), por lo que se puede usar como parte del cribado a gran escala; (ii) se puede usar con cualquier proteína que incluya uno o más restos de Trp (la mayoría de las proteínas), (iii) el uso proteínas de cualquier tamaño y en casi cualquier entorno de solvatación/tampón; (iv) las mediciones pueden ser de alta capacidad (placa de 96 pocillos); (v) las muestras no se consumen, (vi) el planteamiento requiere solo una concentración de muestra baja, y (vii) un solo valor de QUBES captura un conjunto completo de información sobre la conformación de las proteínas. El planteamiento está diseñado para ser usado de manera comparativa y es el más robusto y encuentra la mejor utilidad cuando se examinan, p. ej. variantes de condiciones de tampón para la misma proteína. Dadas las ventajas significativas de QUBES frente a los planteamientos existentes, QUBES puede encontrar una utilidad inmediata tanto en la formulación como en la garantía de calidad de los productos biofarmacéuticos, pero también en los laboratorios académicos en general, que buscan comprender la función de la dinámica de las proteínas en la función de las proteínas. Por ejemplo, actualmente hay un escrutinio intenso de la función de la agregación de proteínas en etapa temprana en proteínas amiloidogénicas implicadas en la enfermedad neurodegenerativa. Dada la muy alta sensibilidad de QUBES para la detección y cuantificación de proteínas de agregados de proteínas solubles, el uso del planteamiento dará una nueva comprensión sobre la formación de estas especies potencialmente tóxicas.

Métodos

Recogida de datos de QUBES. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS50B (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) conectado a un baño de agua circulante para la regulación de la temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$). Las muestras se incubaron durante 5 minutos en las condiciones dadas antes de registrar las mediciones. Las mediciones se realizaron a 10°C , a menos que se indique lo contrario. Las anchuras de las rejillas de excitación y emisión eran de 5 nm. La emisión del triptófano se vigiló de 325 a 500 nm. La longitud de onda de excitación posteriormente se aumentó en pasos de 1 nm para un total de 19 barridos. Se promediaron 3 conjuntos de barridos individuales. El control de tampón correspondiente se restó de los espectros para cada condición experimental y esto también elimina el pico de agua de Raman. El centro de masa espectral (CSM) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$CSM = \frac{\sum f_i \lambda_{em}^2}{\sum f_i} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde f_i es la intensidad de la fluorescencia medida y λ_{em} es la longitud de onda de emisión. Se describe la importancia de usar un intervalo de longitud de onda consistente cuando se dan los datos de CSM, ya que la magnitud dependerá del intervalo de longitud de onda elegido. Los datos de QUBES se extraen ajustando los datos de CSM frente a λ_{ex} como se describe en el manuscrito. El ajuste y la representación gráfica de los datos se realizó usando OriginPro 2016 (Microcal).

Muestras de anticuerpos, desplegado y agregación. Los anticuerpos los proporcionó Bath ASU y se dializaron ampliamente (para experimentos de desnaturalización en urea) o se diluyeron en solución salina tamponada con Tris-Cl a pH 8. Todos los componentes del tampón eran de una calidad espectroscópica. La desnaturalización de anticuerpos se logró por diálisis extensa en una solución tamponada de urea 8 M o urea 0 M como control. La agregación de anticuerpos se logró por incubación a temperaturas elevadas y se vigiló por DLS.

La figura 13 muestra los valores de QUBES para una variedad de mAb que están correlacionados con diferencias en la flexibilidad molecular. **A**, el valor de QUBES se extrae de un espectro combinado de excitación-emisión para restos de Trp de la proteína. **B**, el CSM frente a la longitud de onda de excitación (datos grises) se ajusta a la Ec. 1, para dar un punto de datos único gobernado por 3 parámetros y esto se denomina el valor de QUBES (mostrado en el inserto). **C**, valores de QUBES para una serie de ejemplos de zumab; Pembrolizumab (verde), Vedolizumab (azul), Pertuzumab (naranja), Natalizumab (amarillo), Bevacizumab (índigo), Trastuzumab (rojo), Trastuzumab emtansina (azul claro) y Tocilizumab (verde claro). **D**, los valores de QUBES reflejan la diferencia en la flexibilidad intramolecular entre los mAb de la misma clase que muestran los zumab de color rojo, los ximab (Rituximab, Infliximab y Cetuximab) de color azul y Nivolumab de color negro. Los planos coloreados correspondientes representan el intervalo de confianza al 30% para los conjuntos de datos y son una ayuda visual.

Figura 14. **A**, el valor de QUBES se puede usar para reflejar con precisión y diferenciar entre el desplegado del mAb y la formación de agregados en etapas tempranas. Los valores de QUBES para zumab se muestran en la figura 13C (rojo), incubados en urea 8 M (rojo) y agregados térmicamente (púrpura). **B**, datos de QUBES de Tocilizumab en concentraciones crecientes de urea (los números rojos son [urea] (M)) titulación de urea, **C**, la sensibilidad del valor de QUBES a la agregación. Los datos muestran la titulación de Rituximab completamente agregado en proteína natural

con los puntos de datos secuencialmente de izquierda a derecha correspondientes a 0, 5, 9, 13, 17 y 23% de agregado. **D**, Modelización numérica de fracciones crecientes de Tocilizumab desplegado (azul) y agregado (marrón) basado en valores de QUBES de muestra agregada totalmente desplegada (urea 8 M) y totalmente soluble.

5 Figura 15. **A-E**, compara la sensibilidad del valor de QUBES con los perfiles de DLS. **A**, valores de QUBES para Nivolumab incubado a 65°C con valores registrados cada 30 minutos. **B-E**, perfiles de DLS correspondientes que muestran lecturas tanto de % de intensidad (líneas continuas) como de % de volumen (líneas discontinuas) en comparación con la muestra reciente (negro). No se observó ningún cambio en los perfiles de DLS a las 0.5 h.

10 Figura 16. QUBES predice la estabilidad termodinámica. **A**, una representación del FEL de la proteína que ilustra la conexión entre la flexibilidad de la proteína y el equilibrio de los estados conformacionales y el cambio en los parámetros del valor de QUBES. Las proteínas cada vez más inestables, caracterizadas por un amplio equilibrio de estados conformacionales, situadas más arriba en el FEL, presentan mayores valores de *A* y *CSM₀* y menores valores de *R*. **B**, los valores de QUBES para 3 mAb de ejemplo predicen tener diferentes estabilidades termodinámicas. **C**, la agregación térmicamente dirigida de los mAb en el panel B durante 3 horas [Pertuzumab (rojo) y Vedolizumab (verde)] y [Nivolumab (azul)] a 65°C y una concentración de 0.5 mg/ml. Las flechas indican la transición de 0 horas a 3 horas de incubación. **D**, agregación térmicamente dirigida (5 días a 37°C) de pemrolizumab (negro) en presencia (naranja) y ausencia de glucosa 60 mM, respectivamente. Las flechas indican la transición desde el principio hasta el final de la incubación. **E**, perfiles de DLS correspondientes del panel D. La línea continua negra representa un mAb no agregado.

15

20 Figura 17. Resumen de la capacidad de detección de QUBES. El cambio en la posición de los datos de QUBES por separado refleja el desplegado y agregación, así como la (des)estabilización. La estabilidad de la muestra es un reflejo de la flexibilidad molecular cambiante (rigidez creciente que proporciona estabilidad creciente)

25 Figura 18. Una representación PyMol de una superposición de todos los modelos de homología de RosettaAntibody. Figura 18A, los triptófanos conservados se muestran en la representación de bastones y se resaltan en naranja. Se puede ver que los 47 restos conservados en la cadena V_H (recuadrada) se han modelizado en dos orientaciones diferentes. Los otros restos de triptófano conservados se modelizan en la misma orientación. La figura 18B muestra la misma imagen, pero con todos los restos (conservados y no conservados) resaltados en azul. Está claro que los restos adicionales de triptófano no conservados se encuentran en un área similar de la molécula y parecen estar más cerca del borde de la molécula (menos enterrados).

30 Dentro de cada Fab de mAb estudiado, hay entre 4-7 restos de triptófano. La mayoría de estos restos son conservados en la misma posición dentro de las regiones armazón de las cadenas y se presentan en la misma orientación. La Figura 18 B demuestra que son los triptófanos no conservados los que están menos enterrados, lo que se refleja en valores elevados de SASA. Algunos de estos restos se encuentran en los bucles de CDR. La Figura 18C muestra la correlación del valor de QUBES con el área de superficie accesible al disolvente del Trp (SASA) en la región Fab. La figura 18D muestra la correlación del valor de QUBES con el número de restos de Trp en la región Fab.

La Figura 19 muestra los perfiles de DLS para mAb térmicamente agregados que se muestran en la figura 14A.

35 La Figura 20 muestra la correlación entre la magnitud cambiante del valor de QUBES representado por los parámetros *A* y *R* con el contenido desplegado creciente (azul) y el contenido agregado (marrón).

La Figura 21 muestra una tabla de información de respaldo que muestra un resumen de los parámetros calculados para las regiones Fab del mAb.

40 Aunque se han descrito realizaciones ilustrativas de la invención en detalle en la presente memoria, con referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la invención no se limita a la realización precisa y que un experto en la técnica puede realizar varios cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

1. Uversky VN (2013) A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. *Protein Sci.* 22, 693–724.
2. Tsai CJ, Buyong M, Sham YY, Kumar S y Nussinov R (2001) Structured disorder and conformational selection. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 44, 418–427.
3. Sobolewska-Stawiarz A, Leferink NG, Fisher K, Heyes DJ, Hay S, Rigby SE y Scrutton NS (2014) Energy landscapes and catalysis in nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 289, 11725–11738.
4. Laursen T, Singha A, Rantzau N, Tutkus M, Borch J, Hedegård P, Stamou D, Møller BL y Hatzakis NS (2014) Single molecule activity measurements of cytochrome P450 oxidoreductase reveal the existence of two discrete functional states. *ACS Chem. Biol.* 9, 630–634.
5. Ferreon AC M, Ferreon JC, Wright PE y Deniz A (2013) Modulation of allostery by protein intrinsic disorder. *Nature* 498, 390–394 .
6. Ruotolo BT, Giles K, Campuzano I, Sandercock AM, Bateman RH y Robinson CV (2005) Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science.* 310, 1658-61.
7. Sugase K, Dyson HJ, Wright PE (2007) Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* 447, 1021–1025 .
8. Chattopadhyay A y Haldar S (2014) Dynamic insight into protein structure utilizing red edge excitation shift. *Acc. Chem. Res.* 47, 12–19 .
9. Demchenko A P, (2002) The red-edge effects: 30 years of exploration. *Luminescence* 17, 19–42 .
10. Weber G y Shinitzky M (1970) Failure of Energy Transfer between Identical Aromatic Molecules on Excitation at the Long Wave Edge of the Absorption Spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 65, 823–830 .
11. Galley WC y Purkey RM (1970) Role of heterogeneity of the solvation site in electronic spectra in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 1116–1121.
12. Chattopadhyay A y Mukherjee S (1999) Red Edge Excitation Shift of a Deeply Embedded Membrane Probe: Implications in Water Penetration in the Bilayer. *J. Phys. Chem. B* 103, 8180–8185 .

13. Kelkar D, Chaudhuri A, Haldar S y Chattopadhyay A (2010) Exploring tryptophan dynamics in acid-induced molten globule state of bovine alpha-lactalbumin: a wavelength-selective fluorescence approach. *Eur. Biophys. J.* 39, 1453–1463 .
14. Mitra M, Chaudhuri A y Patra M (2015) Organization and Dynamics of Tryptophan Residues in Brain Spectrin : Novel Insight into Conformational Flexibility. *J Fluoresc.* 25, 707-17 .
15. Chattopadhyay A, Rawat SS, Kelkar D, Ray S y Chakrabarti A (2003) Organization and dynamics of tryptophan residues in erythroid spectrin: novel structural features of denatured spectrin revealed by the wavelength-selective fluorescence approach. *Protein Sci.* 12, 2389–2403.
16. Jain N, Bhasne K, Hemaswathi M y Mukhopadhyay S (2013) Structural and dynamical insights into the membrane-bound α -synuclein. *PLoS One* 8, e83752.
17. Rawat S S, Kelkar D y Chattopadhyay A (2004) Monitoring gramicidin conformations in membranes: a fluorescence approach. *Biophys. J.* 87, 831–843 .
18. Gilmore T D (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.
19. Schröfelbauer B, Polley S, Behar M, Ghosh G y Hoffmann A (2012) NEMO Ensures Signaling Specificity of the Pleiotropic IKK β by Directing Its Kinase Activity toward I κ B α . *Mol. Cell* 47, 111–121 .
20. Thompson, L. M. Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, Martinez-Vincente M, Arrasate M, O'Rourke JG, Khashwji H, Lukacsovich T, Zhu YZ, Lau AL, Massey A, Hayden MR, Zeitlin SO, Finkbeiner S, Green KN, LaFerla FM, Bates G, Huang L, Patterson PH, Lo DC, Cuervo AM, Marsh JL y Steffan JS (2009) IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 187, 1083–1099 .
21. Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y y Tanizawa Y (2006) Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK- γ promote TNF- α -induced serine307 phosphorylation of IRS-1. *J. Cell Biol.* 173, 665–671.
22. Fenner B J, Scannell M y Prehn JHM (2010) Expanding the substantial interactome of NEMO using protein microarrays. *PLoS One* 5, e8799.
23. Catici DAM, Horne J E, Cooper GE y Pudney CR (2015) Poly-ubiquitin drives the molecular interactions of NF- κ B essential modulator by allosteric regulation. *J. Biol. Chem.* 290, 14130-9.
24. Reshetnyak YK, Koshevnik Y y Burstein EA (2001) Decomposition of Protein Tryptophan Fluorescence Spectra into Log- Normal Components . III . Correlation

between Fluorescence and Microenvironment Parameters of Individual Tryptophan Residues. *81*, 1735-58.

25. Demchenko AP (1988) Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of single-tryptophan proteins. *Eur. Biophys. J.* **16**, 121–129.
26. Pan CP, Callis P R y Barkley MD (2006) Dependence of tryptophan emission wavelength on conformation in cyclic hexapeptides. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7009–7016 .
27. Maglia G, Jonckheer A, De Maeyer M, Frère J-M y Engelborghs Y (2008) An unusual red-edge excitation and time-dependent Stokes shift in the single tryptophan mutant protein DD-carboxypeptidase from *Streptomyces*: the role of dynamics and tryptophan rotamers. *Protein Sci.* **17**, 352–361 .
28. Xu J, Chen J, Toptygin D, Tcherkasskaya O, Callis P, King J, Brand L y Knutson JR (2009) Femtosecond fluorescence spectra of tryptophan in human gamma-c rystallin mutants: Site-dependent ultrafast quenching. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16751–16757 .
29. Upadhyay A, Burman JD, Clark EA, Leung E, Isenman DE, van den Elsen JM y Bagby S (2008) Structure-function analysis of the C3 binding region of *Staphylococcus aureus* immune subversion protein Sbi. *J. Biol. Chem.* **283**, 22113–22120.
30. Djikanović D, Kalauzi A, Jeremić M, Mičić M y Radotić K. (2007) Deconvolution of fluorescence spectra: Contribution to the structural analysis of complex molecules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **54**, 188–192.
31. Caarls W, Soledad Celej M, Demchenko AP y Jovin TM. (2010) Characterization of coupled ground state and excited state equilibria by fluorescence spectral deconvolution. *J. Fluoresc.* **20**, 181–190.
32. Dhar A, Samiotakis A, Ebbinghaus S, Nienhaus L, Homouz D, Gruebele M y Cheung MS (2010) Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 17586-91.
33. Akasaka K (2006) Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem. Rev.* **106**, 1814–1835 .
34. Pudney CR, Hay S, Levy C, Pang J, Sutcliffe MJ, Leys D y Scrutton NS (2009) Evidence to support the hypothesis that promoting vibrations enhance the rate of an enzyme catalyzed H-tunneling reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17072–17073 .
35. Hay S, Pudney CR, Sutcliffe MJ y Scrutton NS (2010) Probing active site geometry using high pressure and secondary isotope effects in an enzyme-catalysed ‘deep’ H-tunnelling reaction. *J. Phys. Org. Chem.* **23**, 696–701.

36. Collins M D, Kim CU y Gruner SM (2011) High-pressure protein crystallography and NMR to explore protein conformations. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 81–98.
37. Bagn ris C, Rogala KB, Baratchian M, Zamfir V, Kunze MB, Dagless S, Pirker KF, Collins MK, Hall BA, Barrett TE y Kay CW (2015) Probing the Solution Structure of I B Kinase (IKK) Subunit   and its Interaction with Kaposi’s Sarcoma Associated Herpes Virus Flice Interacting Protein and IKK Subunit   by EPR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **290**, 16539-49
38. Vogt AD y Di Cera E (2013) Conformational selection is a dominant mechanism of ligand binding. *Biochemistry* **52**, 5723–5729.
39. Okazaki K-I y Takada S (2008) Dynamic energy landscape view of coupled binding and protein conformational change: induced-fit versus population-shift mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11182–11187.
40. Wlodarski T y Zagrovic B (2009) Conformational selection and induced fit mechanism underlie specificity in noncovalent interactions with ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19346–19351 .
41. Nussinov R, Ma B y Tsai CJ (2014) Multiple conformational selection and induced fit events take place in allosteric propagation. *Biophys. Chem.* **186**, 22–30 .
42. Mui o, P. L., y Callis, P. R. (2009) Solvent effects on the fluorescence quenching of tryptophan by amides via electron transfer. Experimental and computational studies. *J. Phys. Chem. B.* **113**, 2572–2577.
43. Moens, P. D. J., Helms, M. K., y Jameson, D. M. (2004) Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins. *Protein J.* **23**, 79–83.
44. Azumi, T., Itoh, K., y Shiraishi, H. (1976) Shift of emission band upon the excitation at the long wavelength absorption edge. III. Temperature dependence of the shift and correlation with the time dependent spectral shift. *J.Chem.Phys.* **65**, 2550–2555.
45. Catici, D. A. M., Amos, H. E., Yang, Y., van den Elsen, J. M. H., y Pudney, C. R. (2016) The red edge excitation shift phenomenon can be used to unmask protein structural ensembles: implications for NEMO-ubiquitin interactions. *FEBS J.* **283**, 2272-2284.
46. Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K., y Peterson, M. E. (2008) The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications. *Extremophiles* **12**, 51- 59
47. Morais, M.P.P., Fossey, James, T.D. y Van Den Else, J. M. H. (2012) Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **869**, 93 - 109

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

recibir un espectro de emisión de fluorescencia generado por una muestra de proteína a una primera longitud de onda de excitación, estando configurada dicha muestra de proteína para presentar fluorescencia dependiendo de su estado conformacional;

evaluar, a partir de dicho espectro de emisión de fluorescencia, una indicación característica de una respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína a dicha primera longitud de onda de excitación;

repetir dichas etapas de recepción y evaluación con respecto a una pluralidad de espectros de emisión de fluorescencia, cada espectro de fluorescencia generado por dicha muestra de proteína a una longitud de onda de excitación diferente de dicha primera longitud de onda de excitación;

generar una relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína, comprendiendo dicha relación no lineal una indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína, basada en la correlación de dichas longitudes de onda de excitación e indicaciones evaluadas asociadas características de dicha respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína; y

determinar una caracterización de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína basada en la curvatura de dicha relación no lineal generada.

2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína comprende: una indicación de una magnitud de curvatura de dicha relación entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína.

3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína comprende uno o más de: una indicación de un número de estados conformacionales discretos de una proteína en dicha muestra de proteína; una indicación de un paisaje de energía libre de una proteína en dicha muestra de proteína; una indicación de una naturaleza relativa de plegamiento o desplegado de dicho estado conformacional de una proteína en dicha muestra de proteína; una indicación del amontonamiento de una proteína en dicha muestra de proteína; una indicación de la compacidad física de una proteína en dicha muestra de proteína; una indicación característica de la respuesta de fluorescencia que se determina que es independiente en un intervalo de longitudes de onda de excitación.

4. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína comprende: una función exponencial o una función de probabilidad exponencial simétrica o asimétrica.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína comprende:

una distribución de probabilidad gaussiana de la forma:

$$f(x) = R_0 + \frac{A\sqrt{2/\pi}}{w} \exp\left(-2\left(\frac{x-m}{w}\right)^2\right)$$

donde A es el área, w es la anchura a mitad de altura máxima, m es el punto medio y R_0 es la intersección en y, y $m = \lambda_{REES}^{máx}$ donde $\lambda_{REES}^{máx}$ es la longitud de onda de excitación que da el mayor cambio en la longitud de onda del pico de emisión de fluorescencia.

6. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha muestra de proteína comprende: una proteína, disolvente y tampón, y dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional comprende una indicación de dicho estado conformacional de dicha proteína en dicho disolvente y tampón.

7. Un método según una cualquiera de la reivindicación 3 cuando depende de la reivindicación 2 o de las reivindicaciones 4 a 6 cuando dependen de la reivindicación 2 y reivindicación 3, en donde dicha indicación característica de la respuesta de fluorescencia que se determina que es independiente a lo largo de un intervalo de longitudes de onda de excitación, y dicha indicación de una magnitud de curvatura de dicha relación entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína, comprenden juntas una huella bidimensional característica de dicha muestra de proteína.

8. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende: generar dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína para una pluralidad de muestras de proteína diferentes.
- 5 9. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende uno o más de: comparar dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína con una indicación generada previamente de al menos una característica de dicho estado conformacional de una muestra de proteína idéntica; comparar dicha indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína, con una indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional de una muestra de proteína que comprende la misma proteína que tiene diferentes uno o más de: concentración, disolvente y tampón.
- 10 10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha muestra de proteína comprende: una proteína que incluye al menos un fluoróforo intrínseco.
11. Un método según la reivindicación 10, en donde dicho fluoróforo intrínseco comprende: triptófano.
12. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha muestra de proteína comprende una proteína que incluye al menos un fluoróforo extrínseco.
- 15 13. Un producto de programa informático operable, cuando es ejecutado por un ordenador, para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Una unidad de análisis estructural de proteínas que comprende:
- 20 lógica de recepción configurada para recibir un espectro de emisión de fluorescencia generado por una muestra de proteína a una primera longitud de onda de excitación, estando configurada dicha muestra de proteína para presentar fluorescencia dependiendo de su estado conformacional;
- lógica de evaluación configurada para evaluar, a partir de dicho espectro de emisión de fluorescencia, una indicación característica de una respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína a dicha primera longitud de onda de excitación;
- 25 lógica de comparación configurada para comparar datos generados por dicha lógica de recepción y evaluación en relación con una pluralidad de espectros de emisión de fluorescencia, cada espectro de fluorescencia generado por dicha muestra de proteína a una longitud de onda de excitación diferente de dicha primera longitud de onda de excitación; estando dicha lógica de comparación configurada para generar una relación no lineal entre la longitud de onda de excitación y la indicación característica de la respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína, comprendiendo dicha relación no lineal una indicación de al menos una característica de dicho estado conformacional
- 30 de dicha muestra de proteína, basada en la correlación de dichas longitudes de onda de excitación y las indicaciones evaluadas asociadas características de dicha respuesta de fluorescencia de dicha muestra de proteína; y
- lógica de caracterización configurada para determinar una caracterización de dicho estado conformacional de dicha muestra de proteína basada en la curvatura de dicha relación no lineal generada.
15. Aparato de análisis estructural de proteínas que comprende:
- 35 un soporte de muestra configurado para recibir una muestra de proteína;
- una fuente de luz controlable operable para excitar dicha muestra de proteína;
- un detector operable para recibir un espectro de emisión de fluorescencia producido por dicha muestra de proteína; y
- una unidad de control configurada para comunicarse con dicha fuente de luz controlable y detector, comprendiendo dicha unidad de control una unidad de análisis estructural de proteínas de acuerdo con la reivindicación 14.

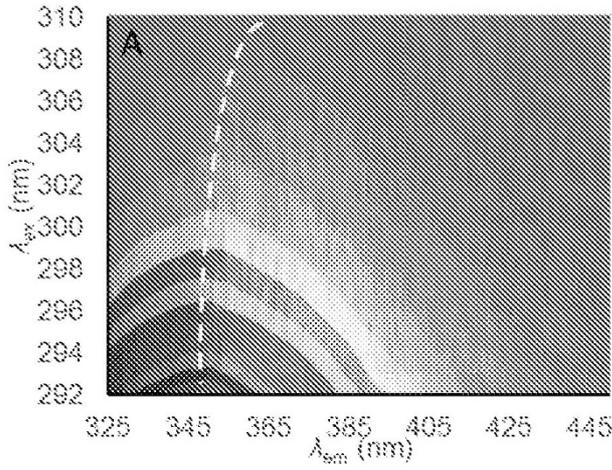


Figura 1a

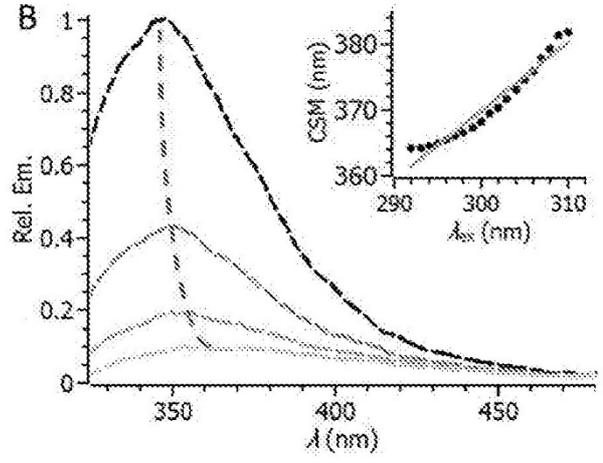


Figura 1b

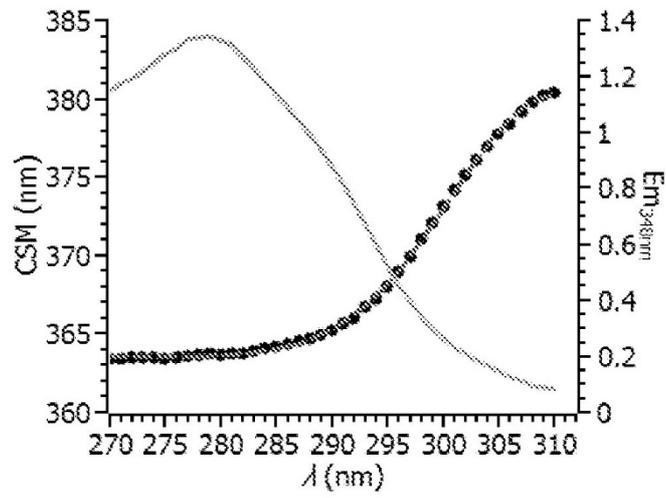


Figura 2

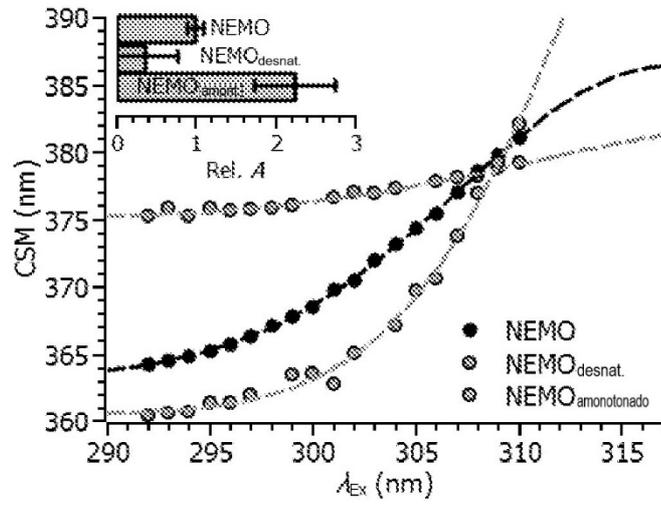


Figura 3

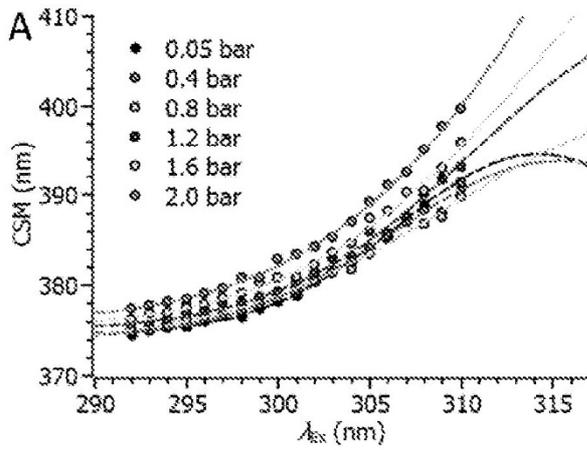


Figura 4a

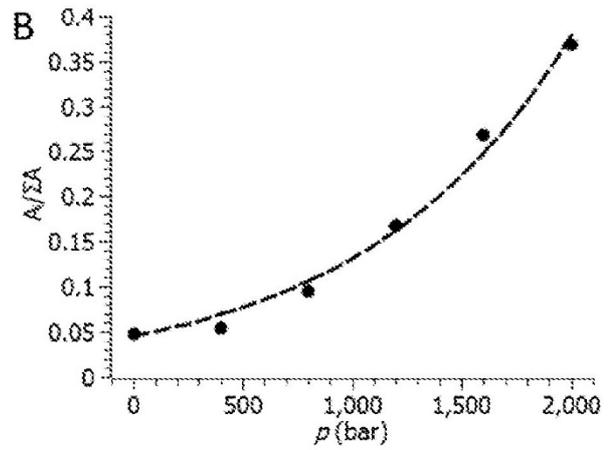


Figura 4b

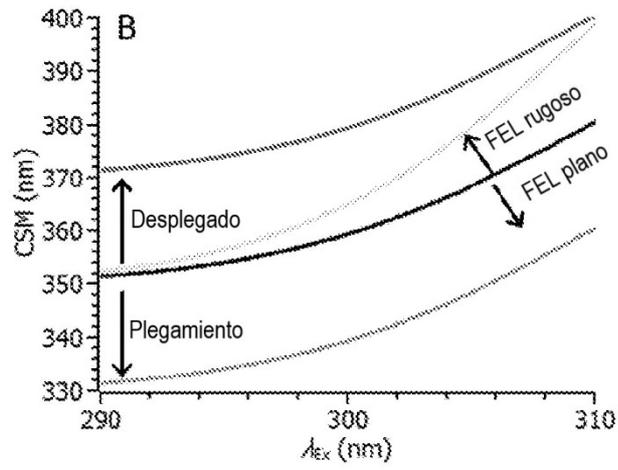


Figura 5

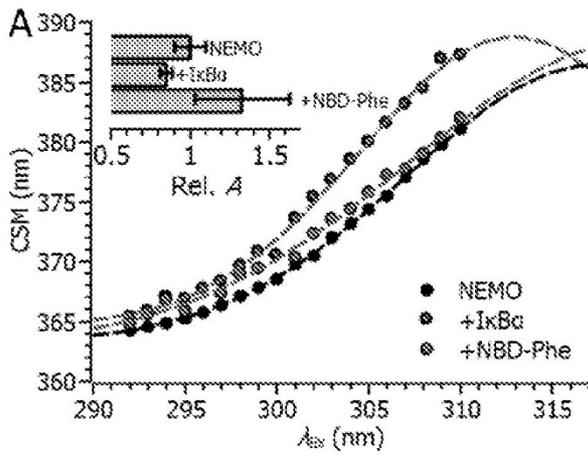


Figura 6a

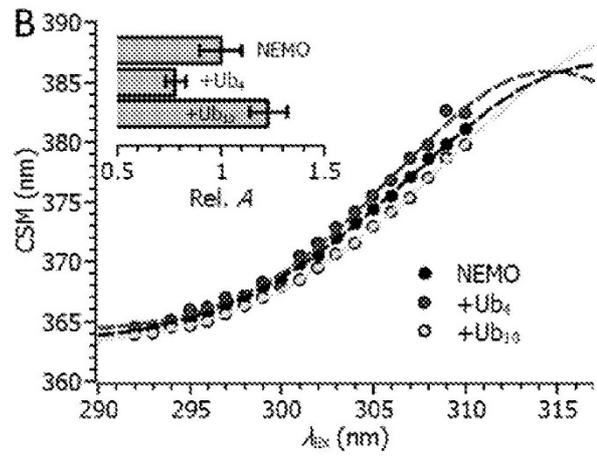
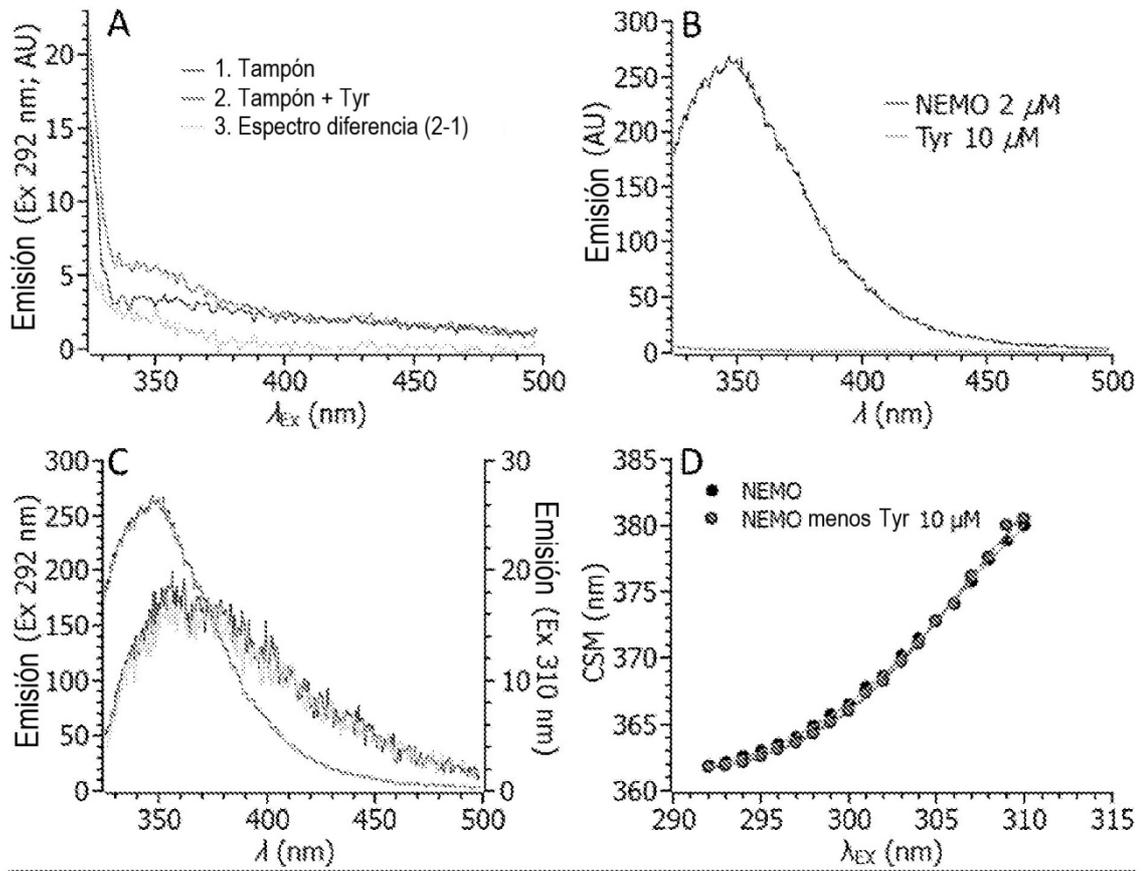


Figura 6b



Figuras 7a a 7d

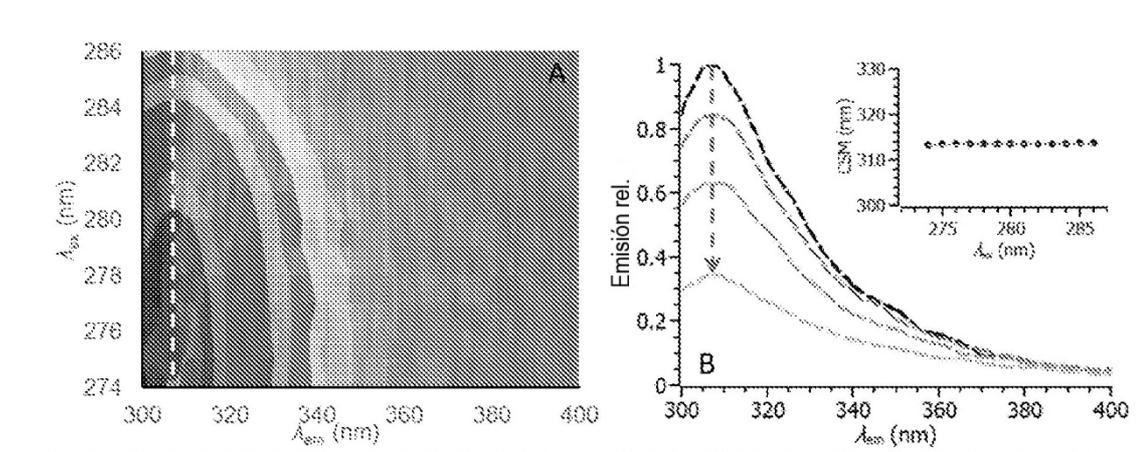


Figura 8a

Figura 8b

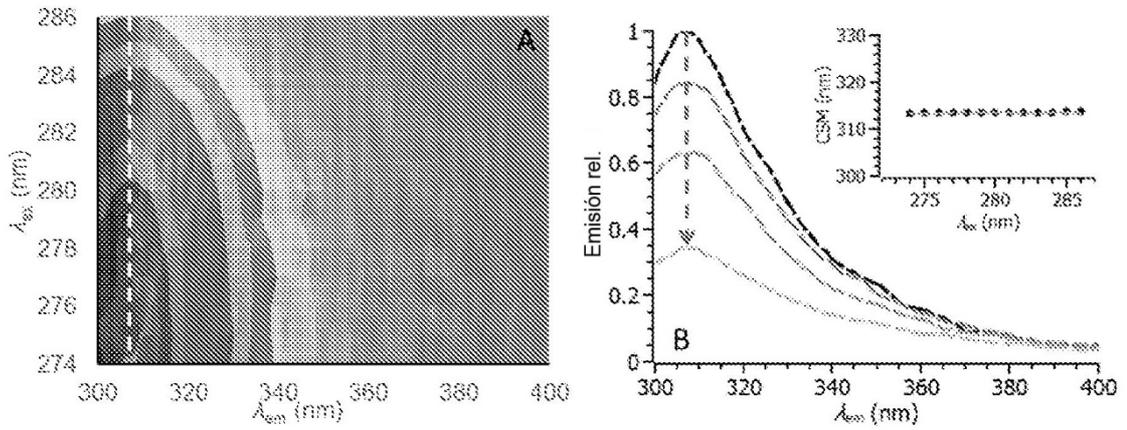


Figura 9a

Figura 9b

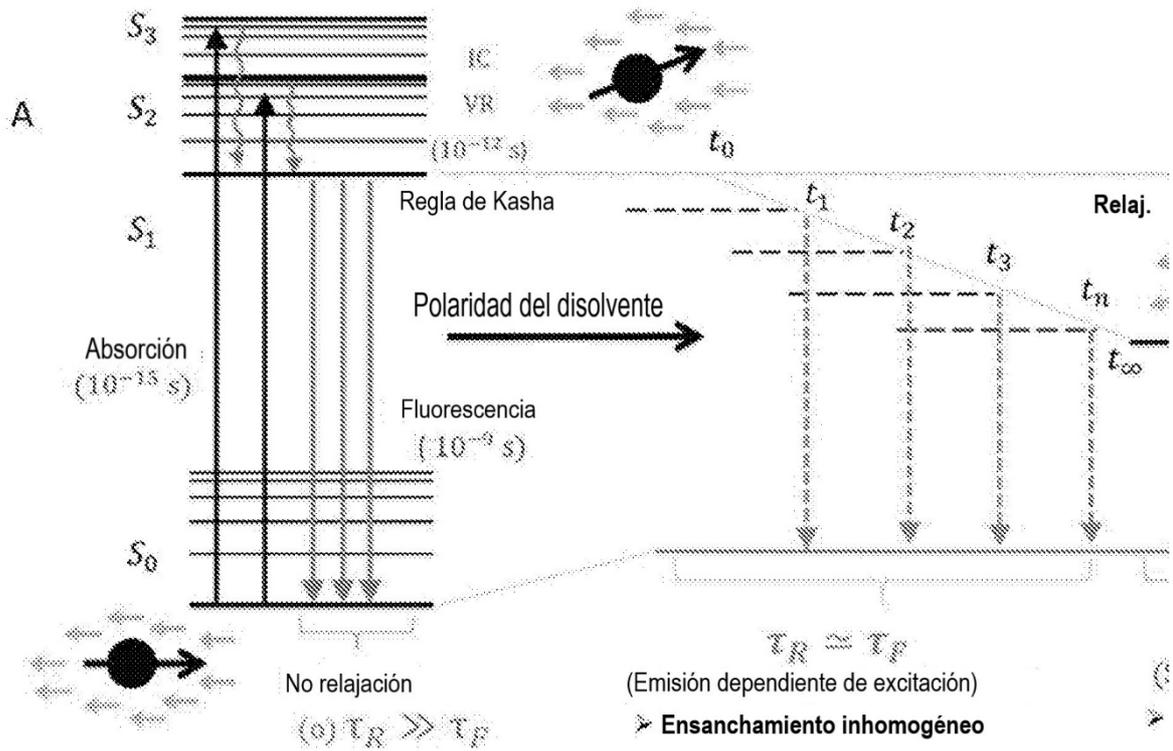


Figura 10a

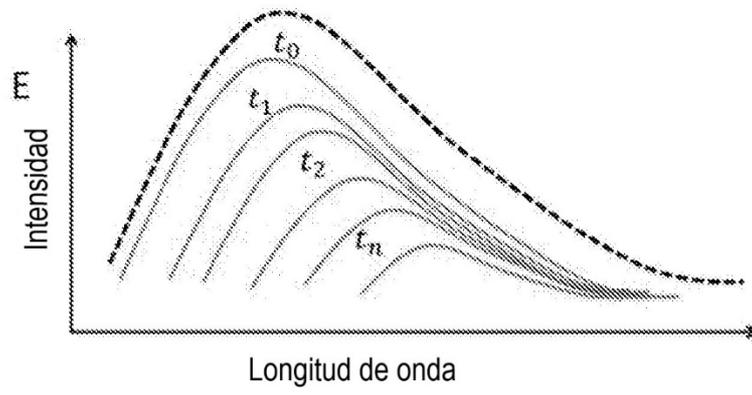


Figura 10 b

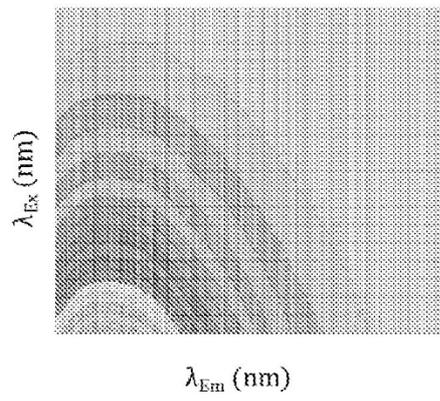


Figura 10 c

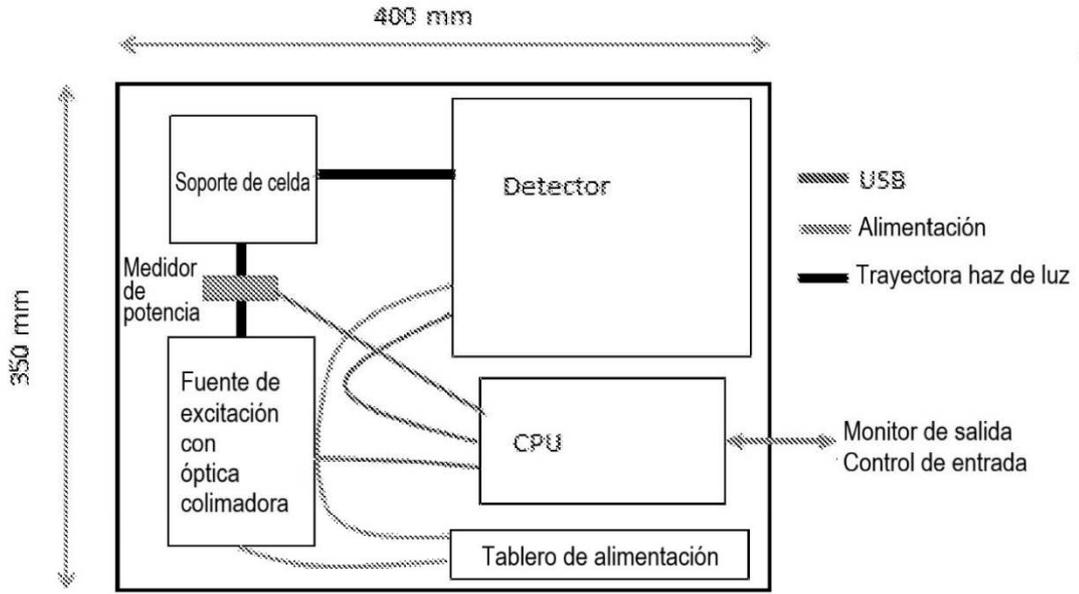
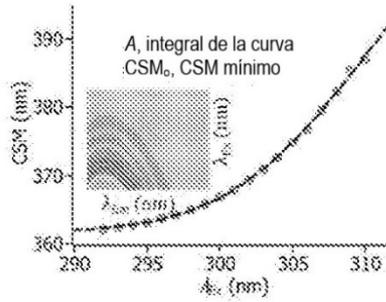


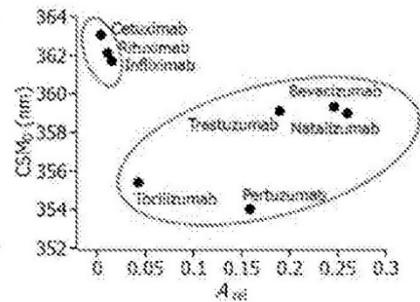
Figura 11



(a)

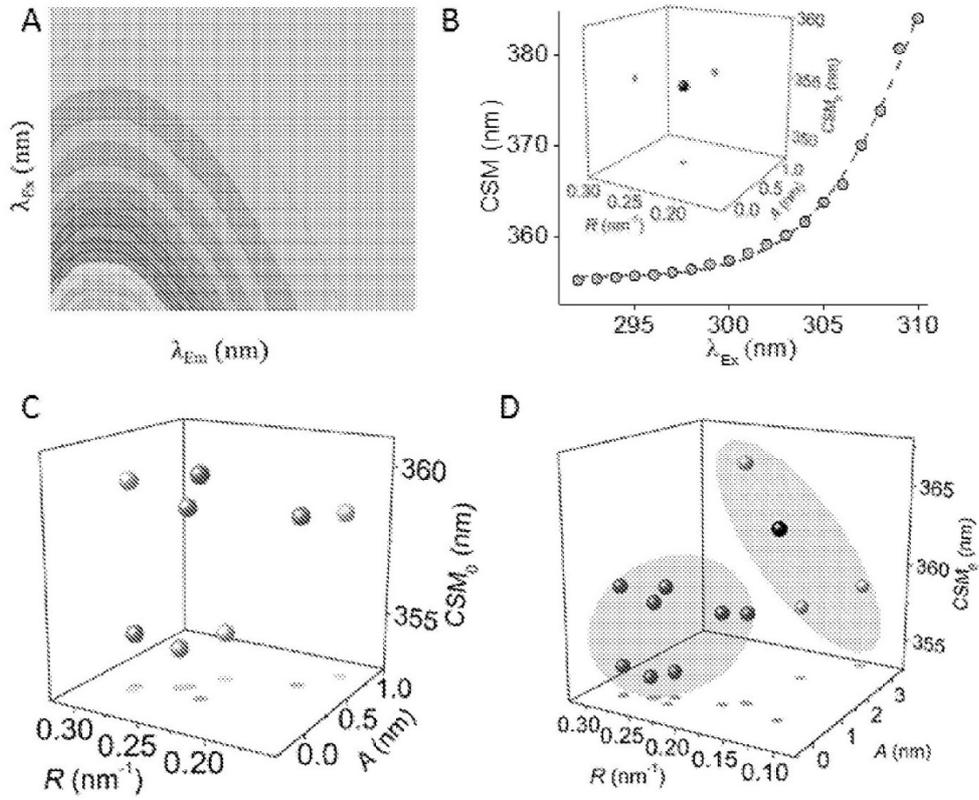


(b)

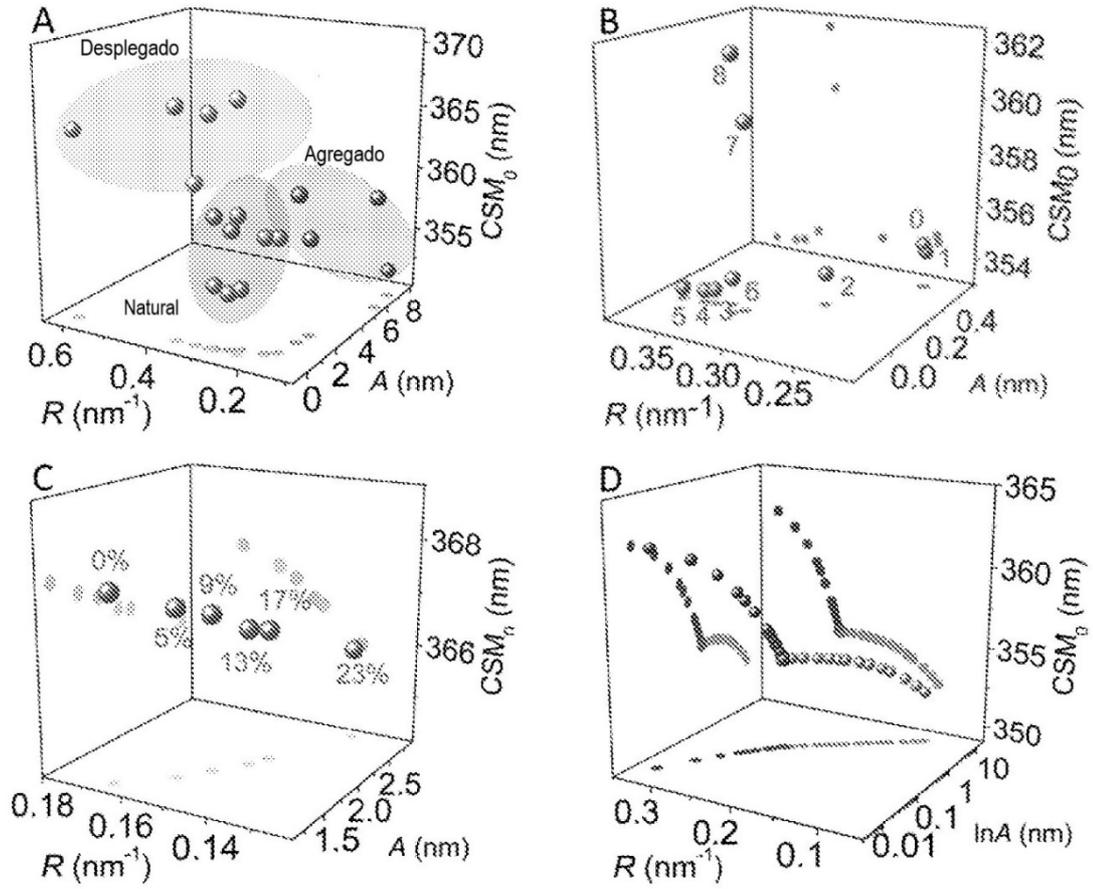


(c)

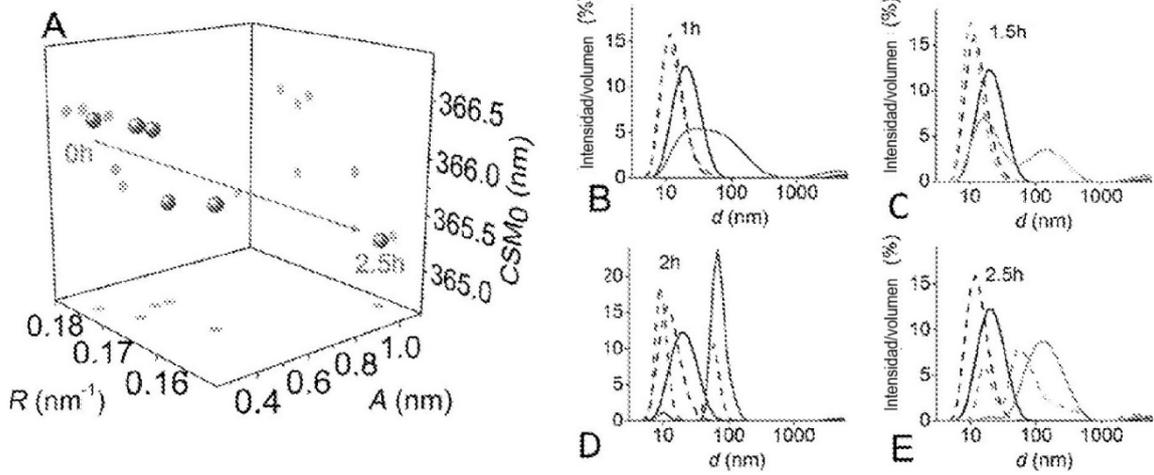
Figuras 12a a 12c



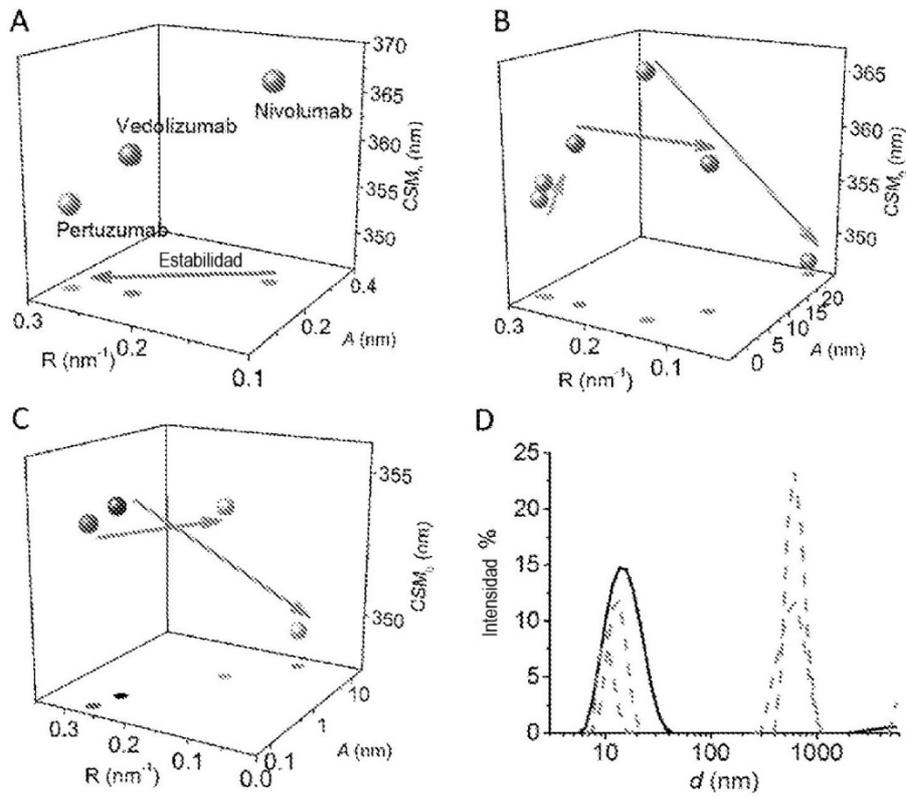
Figuras 13A a 13D



Figuras 14A a 14D



Figuras 15A a 15E



Figuras 16A a D

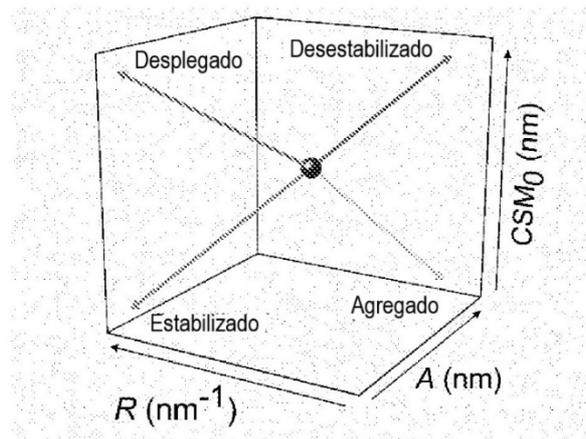


Figura 17

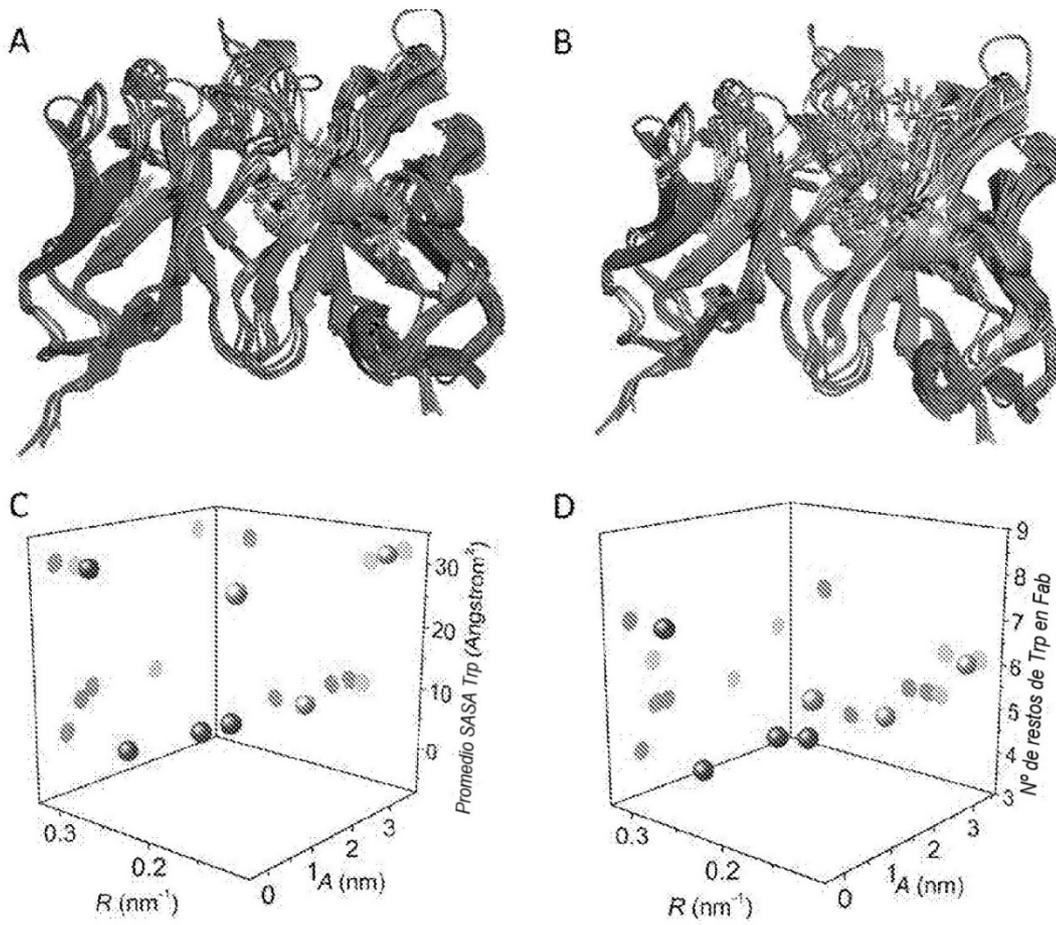


Figura 18A a D

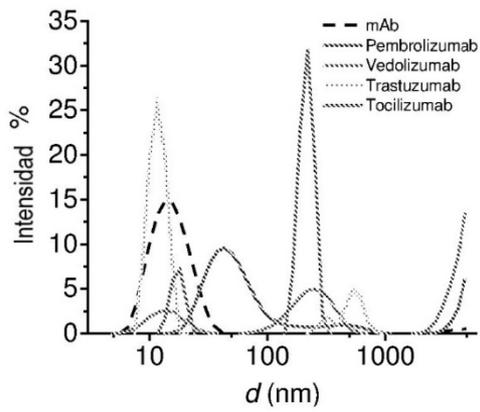


Figura 19

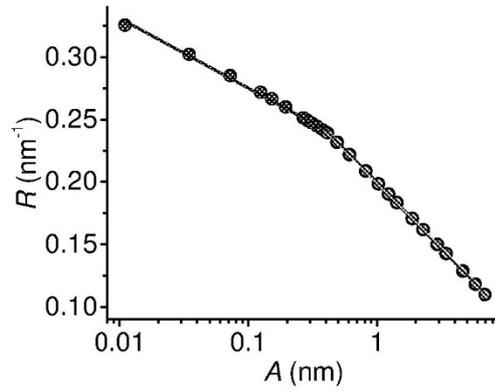


Figura 20

Resumen de parámetros calculados para regiones Fab de mAb

	Número de restos de Trp en Fab	Promedio Trp SASA trp (Å ²)	Promedio normalizado Trp factor B	Frecuencia acumulada de modos normales calculados	Movimiento flexible todos los átomos SVRC
Quimérico					
Cetuximab	6	31.7	0.583	456.4	0.60
Infliximab	6	29.3	0.630	444.5	0.44
Rituximab	5	8.8	0.648	394.2	0.55
Humanizado					
Bevacizumab	7	30.3	0.528	454.5	0.67
Natalizumab	5	8.9	0.620	392.4	0.50
Pertuzumab	4	2.6	0.510	502.3	0.75
Trastuzumab	5	7.4	0.639	435.8	0.56

Figura 21