

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 256**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/US2015/059342**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073794**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15797531 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3215525**

54 Título: **Métodos para producir proteínas bicatenarias en bacterias**

30 Prioridad:

05.11.2014 US 201462075798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2021

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**GIULIANOTTI, JAMES;
REILLY, DOROTHEA;
AURORI, KIERAN y
SIMMONS, LAURA, C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 819 256 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para producir proteínas bicatenarias en bacterias

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a métodos para producir polipéptidos recombinantes, tales como proteínas del receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC). Más específicamente, esta divulgación se refiere a métodos para producir proteínas secretoras heterólogas en bacterias mediante la utilización de vectores de expresión optimizados y procesos de cultivo.

Antecedentes

La producción de proteínas recombinantes en células huésped procariotas ha sido una fuente de muchos agentes terapéuticos importantes desde la producción de insulina humana en *E. coli* en 1978. A medida que han avanzado las herramientas y el conocimiento de biología molecular, también ha aumentado la complejidad de los productos terapéuticos recombinantes. La producción de estas proteínas recombinantes requiere que los productos exhiban propiedades tales como una traducción, plegamiento, ensamblaje, enlace disulfuro y transporte adecuados al periplasma. Se sabe que la expresión de muchas proteínas recombinantes, particularmente aquellas con enlaces disulfuro (por ejemplo, proteínas bicatenarias, incluyendo, sin limitación, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos), conduce a la formación de cuerpos de inclusión en células huésped procariotas (Spadiut *et al.*, Trends in Biotechnology, 32:54, 2014). Por consiguiente, existe una demanda de sistemas y procesos de expresión para la producción recombinante de proteínas bicatenarias correctamente plegadas y ensambladas en células huésped procariotas a escala industrial.

Los anticuerpos monoclonales representan uno de los tipos de agentes terapéuticos recombinantes de más rápido crecimiento, con numerosos anticuerpos monoclonales ya aprobados o en revisión para el tratamiento de diversas enfermedades (Nelson *et al.*, *Nature Review Drug Discovery*, 9:767, 2010). Los anticuerpos monoclonales tradicionales se unen a un solo antígeno diana. Para muchas enfermedades, puede ser ventajoso emplear anticuerpos que se unen a más de un antígeno diana, es decir, anticuerpos multiespecíficos. Dichos anticuerpos se pueden emplear en enfoques combinatorios dirigidos contra múltiples dianas terapéuticas (véanse, por ejemplo, Bostrom *et al.*, *Science* 323:1610, 2009; y Wu *et al.*, *Nature Biotechnology*, 25:1290, 2007). Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos biespecíficos que se unen simultáneamente a un epítipo expresado en la superficie de una célula cancerosa y a un epítipo expresado en un linfocito T para inducir la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T (Shalaby *et al.*, *Clinical Immunology*, 74:185, 1995).

El uso de anticuerpos biespecíficos en la clínica requiere la capacidad de producir proteínas bicatenarias en cantidades industrialmente relevantes. Aunque se han descrito componentes vectoriales que mejoran la producción de proteínas recombinantes en células huésped procariotas (véanse, por ejemplo, Schlapschy *et al.*, *Protein Engineering, Design and Selection*, 19:385, 2006; y Simmons *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 263: 133, 2002), los resultados descritos en el presente documento demuestran que las modificaciones de los vectores de expresión en solitario no resuelven todos los problemas de producción encontrados durante la fabricación de proteínas bicatenarias. Sigue existiendo la necesidad de métodos óptimos para producir de manera eficiente proteínas bicatenarias recombinantes, tales como fragmentos de anticuerpos y semianticuerpos, a escala preparativa.

El documento WO 02/061090 describe la expresión procariótica y la producción de anticuerpos aglucosilados de longitud completa donde, por ejemplo, los anticuerpos se expresan conjuntamente con DsbC o FkpA para mejorar el replegamiento.

Sumario

En el presente documento se describen métodos para producir un polipéptido que comprende dos cadenas en una célula huésped procariota, comprendiendo el método: (a) cultivar la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, por lo que, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; en el que la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; y (3) una tercera unidad de traducción que codifica al menos una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas; en el que la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que comprenden: una fase de crecimiento que comprende una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que comprende una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, en el que la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción; y (b) recuperar el polipéptido biológicamente activo de la célula huésped. La invención es un método para producir un receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC) que comprende una cadena alfa del receptor de linfocitos T (TCR) y una cadena beta de TCR en una célula huésped de *E. coli*, comprendiendo el método: (a) cultivar la célula huésped de *E. coli* para expresar la cadena alfa de TCR y

la cadena beta de TCR del ImmTAC en un medio de cultivo en condiciones que comprenden: una fase de crecimiento que comprende una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que comprende una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, por lo que, tras la expresión la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR, se pliegan y se ensamblan para formar un ImmTAC biológicamente activo en la célula huésped de *E. coli*; en el que la célula huésped de *E. coli* comprende un polinucleótido que comprende: (1) una primera unidad de traducción que codifica la cadena alfa de TCR del ImmTAC; (2) una segunda unidad de traducción que codifica la cadena beta de TCR del ImmTAC; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una peptidil-prolil isomerasa, en la que la peptidil-prolil isomerasa es una proteína FkpA; y (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una proteína disulfuro oxidorreductasa, en la que la proteína disulfuro oxidorreductasa es una proteína DsbC; en el que la temperatura de crecimiento está en el intervalo de 30 °C a 34 °C durante la fase de crecimiento, en el que la temperatura de producción está en el intervalo de 25 °C a 29 °C durante la fase de producción, en el que la velocidad de agitación del crecimiento es suficiente para lograr una velocidad máxima de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de crecimiento en el intervalo de 3,5 a 4,5 mmol/l/min, y en el que la velocidad de agitación de producción es suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de producción en el intervalo de 1,0 a 3,0 mmol/l/min; y (b) recuperar el ImmTAC biológicamente activo de la célula huésped de *E. coli*. También se describen métodos para producir un polipéptido que comprende dos cadenas en una célula huésped procarionta, comprendiendo el método: (a) cultivar la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, por lo que, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; en el que la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende: (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una primera proteína chaperona; (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una segunda proteína chaperona; y (5) una quinta unidad de traducción que codifica una tercera proteína chaperona, en el que la primera, segunda y tercera proteínas chaperonas se seleccionan del grupo que consiste en peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidorreductasas, y combinaciones de las mismas; en el que la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que comprenden: una fase de crecimiento que comprende una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que comprende una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, en el que la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción; y (b) recuperar el polipéptido biológicamente activo de la célula huésped. También se describen métodos para producir un receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC) que comprende una cadena alfa del receptor de linfocitos T (TCR) y una cadena beta de TCR en una célula huésped procarionta, comprendiendo los métodos: (a) cultivar la célula huésped para expresar la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR del ImmTAC en un medio de cultivo en condiciones que comprenden: una fase de crecimiento que comprende una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que comprende una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, por lo que, tras la expresión la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR, se pliegan y se ensamblan para formar un ImmTAC biológicamente activo en la célula huésped; en el que la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende: (1) una primera unidad de traducción que codifica la cadena alfa de TCR del ImmTAC; (2) una segunda unidad de traducción que codifica la cadena beta de TCR del ImmTAC; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una primera proteína chaperona; (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una segunda proteína chaperona; y (5) una quinta unidad de traducción que codifica una tercera proteína chaperona, en el que la primera, segunda y tercera proteínas chaperonas se seleccionan del grupo que consiste en peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidorreductasas, y combinaciones de las mismas; en el que la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción; y (b) recuperar el ImmTAC biológicamente activo de la célula huésped. En algunos casos, el polipéptido comprende tres, cuatro o cinco cadenas. En algunos casos, el pH del medio de cultivo se mantiene a un pH en el intervalo de entre 6,7 y 7,3 durante la fase de producción. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende además tres copias de un promotor, en el que una primera copia está en combinación operativa con la primera unidad de traducción, una segunda copia está en combinación operativa con la segunda unidad de traducción, y una tercera copia está en combinación operativa con la tercera unidad de traducción para impulsar la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína FkpA. En algunos casos, dos de las unidades de traducción que codifican dos de las tres proteínas chaperonas son parte de una sola unidad de transcripción (unidad bicistrónica). En algunos casos, el polinucleótido comprende además un promotor en combinación operativa con cada unidad de traducción. En algunos casos, el promotor es un promotor inducible. En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor inducible por IPTG que impulsa la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína chaperona en ausencia de inducción por IPTG. En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor inducible por IPTG que impulsa la transcripción de la cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR y la proteína FkpA en ausencia de inducción por IPTG. En algunos casos, el promotor inducible es un promotor Pho que impulsa la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína chaperona cuando el fosfato en el medio de cultivo se ha agotado. En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor Pho que impulsa la transcripción de la cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR y la proteína FkpA cuando el fosfato en el medio de cultivo se ha agotado. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende además un marcador seleccionable y el medio de cultivo comprende un agente de selección que consiste en un único antibiótico para hacer que la célula huésped de *E. coli* conserve el polinucleótido. En algunos casos, la primera unidad de traducción comprende una primera región de inicio de la

traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la primera cadena, y la segunda unidad de traducción comprende una segunda región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la segunda cadena, en las que la fuerza de traducción relativa de la primera y segunda TIR es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0. En algunas realizaciones, la primera unidad de traducción comprende una primera región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la cadena alfa de TCR, y la segunda unidad de traducción comprende una segunda región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la cadena beta de TCR, en las que la fuerza de traducción relativa de la primera y segunda TIR es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0. En algunos casos, la al menos una proteína de chaperona, o la primera proteína chaperona, comprende una peptidil-prolil isomerasa. En algunos casos, la peptidil-prolil isomerasa es una proteína FkpA. En algunas realizaciones, la FkpA es FkpA de *E. coli*. En algunos casos, la al menos una proteína chaperona comprende además una o ambas de la segunda proteína chaperona, y la tercera proteína chaperona comprende una proteína disulfuro oxidorreductasa. En algunos casos, la proteína disulfuro oxidorreductasa es una o ambas de una proteína DsbA y una proteína DsbC. En algunas realizaciones, la al menos una proteína disulfuro oxidorreductasa es DsbC de *E. coli*. En algunos casos, la célula huésped procarionta es una bacteria gramnegativa. En algunos casos, *E. coli* es de una cepa deficiente en actividad proteasa endógena. En algunas realizaciones, *E. coli* es una cepa con una mutación *degpS210A*. En algunas realizaciones, *E. coli* es una cepa con un genotipo de W3110 $\Delta fhuA$ - $\Delta phoA$ *ilvG2096* (Val^r) Δprc spr43H1 $\Delta degP$ $\Delta manA$ *lacI*^R $\Delta ompT$ $\Delta menE$ *degpS210A*. En algunos casos, el polipéptido es heterólogo de la célula huésped. En algunos casos, el polipéptido es un monómero de un heterodímero (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). En algunas realizaciones, la cadena alfa de TCR comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR y un dominio constante de cadena alfa de TCR, y la cadena beta de TCR comprende un dominio variable de cadena beta de TCR y un dominio constante de cadena beta de TCR. En algunos casos, las dos cadenas del polipéptido están unidas entre sí mediante al menos un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, las dos cadenas del ImmTAC están unidas entre sí por al menos un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, el ImmTAC comprende además un fragmento de anticuerpo que se une a un linfocito T y activa una respuesta de linfocitos T. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-CD3. En algunas realizaciones, el ImmTAC comprende un TCR genomanipulado para poseer una mayor afinidad por un antígeno, en comparación con la afinidad por el antígeno de un TCR que no ha sido genomanipulado. En algunos casos, las dos cadenas del polipéptido están unidas entre sí mediante un enlazador polipeptídico. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo monovalente en el que la primera cadena y la segunda cadena comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina. En algunos casos, la cadena pesada de inmunoglobulina es un isotipo IgG1 o IgG4. En algunos casos, el anticuerpo monovalente es capaz de unirse específicamente a un antígeno. En algunos casos, el antígeno es una citocina. En algunos casos, la citocina se selecciona del grupo que consiste en una quimiocina, un interferón, una interleucina, una linfocina y un factor de necrosis tumoral. En algunos casos, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento endotelial vascular. En algunos casos, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en IL-4, IL13, IL-14, IL-17, VEGFA y VEGFC. En algunos casos, el polipéptido es una proteína secretora recuperada del periplasma de la célula huésped. En algunas realizaciones, el ImmTAC se recupera del periplasma de la célula huésped. En algunos casos, el polipéptido es un receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC) que comprende un receptor de linfocitos T soluble con afinidad mejorada fusionado a un fragmento variable monocatenario anti-CD3 (scFv). En la invención, la temperatura de crecimiento está en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 34 °C durante la fase de crecimiento, y la temperatura de producción está en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 29 °C durante la fase de producción. En algunas realizaciones, la velocidad de agitación del crecimiento está en el intervalo de aproximadamente 600 a 800 rpm durante la fase de crecimiento, y la velocidad de agitación de producción está en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 rpm durante la fase de producción. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento es suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento de 0,5 a 2,5 mmol/l/min por encima de la velocidad de consumo de oxígeno máxima en la célula huésped durante la fase de producción. En la invención, la velocidad de consumo de oxígeno máxima de la célula huésped durante la fase de crecimiento está en el intervalo de 3,5 a 4,5 mmol/l/min, y la velocidad de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de producción está en el intervalo de 1,0 a 3,0 mmol/l/min. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento es de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 40 % (rpm/rpm) más alta que la velocidad de agitación de producción.

Debe entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente divulgación. Estos y otros aspectos de la divulgación resultarán evidentes para un experto en la técnica. Estas y otras realizaciones de la divulgación se describen adicionalmente mediante la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1A-C** muestra la producción de subunidades totales de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) a partir del vector de producción del semianticuerpo (hAb) xIL13. La **figura 1A** proporciona un gráfico de subunidades totales para LC y HC producidas a partir de los vectores de producción TIR1,1 (barras de color negro) y TIR2,2 (barras a rayas), según lo medido por RP-HPLC. La **figura 1B** proporciona un gráfico de las subunidades totales producidas para LC y HC (barras de color negro) o LC y HC solubles (barras de color gris) a partir de los vectores de producción TIR1,1. La **figura 1C** proporciona un gráfico de las subunidades totales producidas para LC y HC

totales (barras de color negro) o LC y HC solubles (barras de color gris) a partir de los vectores de producción TIR2,2.

La **figura 2** muestra el título de xIL13 hAb usando vectores de producción de hAb TIR1,1 (barra de color negro) o TIR2,2 (barra a rayas) según lo medido por RP-HPLC de columna dual.

La **figura 3A-B** ilustra el plegamiento y ensamblaje de proteínas en células huésped bacterianas. La **figura 3A** es un esquema que representa la producción de proteínas bacterianas, que ilustra el plegamiento y ensamblaje de proteínas en el periplasma utilizando chaperonas. La **figura 3B** es una lista de proteínas chaperonas, incluyendo peptidil-prolil isomerasas ("Ppiasas"), oxidorreductasas, y otras chaperonas.

La **figura 4A** muestra el sistema compatible utilizado para cribar variantes de FkpA. La **figura 4B** muestra la generación de un único plásmido xIL13 (pxIL13.2.2.FkpAc13) que codifica un anticuerpo LC, HC y FkpA.

La **figura 5A-B** muestra la producción del xVEGF IgG1 hAb tras la titulación de la expresión de FkpA. La **figura 5A** representa una transferencia de Western que muestra hAb y acumulación de cadena pesada monomérica soluble tras la expresión de diferentes niveles de FkpA, mientras que un gel teñido con Coomassie muestra la producción de proteína soluble total en cada condición. La **figura 5B** es un gráfico que muestra el título de hAb producido tras la expresión de diferentes niveles de FkpA.

La **figura 6A-B** muestra la producción de xIL13 IgG4 hAb tras la expresión de diferentes niveles de FkpA. La **figura 6A** proporciona un gráfico que muestra el título del xIL13 hAb producido usando diferentes sistemas de vectores, y está acompañado por una transferencia de Western que muestra hAb y acumulación de cadena pesada monomérica soluble en cada condición. La **figura 6B** proporciona un gráfico que muestra la cantidad de FkpA

producida usando diferentes sistemas de vectores, y se acompaña de una transferencia de Western que muestra la expresión de FkpA en cada condición. En ambos paneles, "niveles de FkpA endógenos" se refiere a células huésped bacterianas que no contienen un plásmido que codifique FkpA; "niveles de FkpA compatibles" se refiere a la expresión de xIL13 y FkpA de plásmidos separados (compatibles); y "niveles únicos de FkpA" se refiere a un único vector que expresa tanto xIL13 como FkpA. La **figura 7A-B** muestra la producción del xIL4 IgG4 hAb tras la expresión inducible de FkpA. La **figura 7A** representa una transferencia de Western que muestra hAb y acumulación de cadena pesada monomérica soluble. La **figura 7B** proporciona un gráfico que muestra el título del xIL4 hAb producido usando la expresión inducible de FkpA, y está acompañado por una transferencia de Western que muestra la expresión de FkpA. En ambos paneles, la muestra 1 usa un vector TIR1,1 para la producción de xIL4 hAb y no sobreexpresa FkpA; la muestra 2 usa un vector TIR2,2 para la producción de xIL4 hAb y no sobreexpresa FkpA; la muestra 3 usa TIR1,1 para producir el xIL4 hAb e IPTG para inducir la expresión de FkpA; y la muestra 4 usa TIR2,2 para producir el xIL4 hAb e IPTG para inducir la expresión de FkpA.

La **figura 8A-C** muestra la producción del xVEGFC IgG1 hAb tras la expresión de FkpA. La **figura 8A** proporciona un gráfico que muestra el título del xVEGFC hAb producido usando diferentes sistemas de vectores. La **figura 8B** representa un gel que muestra la producción de proteína soluble total en ambas condiciones, con las bandas FkpA según se etiquetan. La **figura 8C** representa una transferencia de Western que muestra la acumulación del xVEGFC hAb y la cadena pesada monomérica soluble. En los paneles de todos los paneles, la muestra 1 usa un vector TIR2,2 para la producción del xVEGFC hAb y no contiene un plásmido para la expresión de FkpA; la muestra 2 usa un vector TIR2,2 para la producción de xIL4 hAb e IPTG para inducir la expresión de FkpA.

La **figura 9** muestra el sistema plasmídico compatible que emplea un primer plásmido para la expresión de xIL13 hAb (pxIL13.2.2.FkpAc13) y un segundo plásmido para la expresión de DsbA y DsbC (pJJ247). La **figura 10** proporciona un gráfico que muestra la producción del xIL13 hAb en el tiempo utilizando el plásmido de producción xIL13.2.2.FkpAc13 y un plásmido compatible para la expresión de DsbA y DsbC, con y sin inducción por IPTG.

La **figura 11A** muestra el sistema plasmídico compatible con xIL14 hAb. La **figura 11B** muestra la generación de un solo plásmido que codifica las LC y HC de xIL14 hAb, FkpA, DsbA, y DsbC.

La **figura 12A-B** muestra la producción del xIL4 hAb con el vector TIR1,1 o TIR2,2 en ausencia de expresión de FkpA, DsbA y DsbC (1 y 2, como se etiqueta); en presencia de la expresión de FkpA inducida por IPTG (3 y 4, como se etiqueta); y en presencia de un plásmido con FkpA, DsbA y DsbC en ausencia de IPTG (5 y 6, como se etiqueta). La **figura 12A** representa una transferencia de Western que muestra la acumulación del xIL4 hAb y la cadena pesada monomérica soluble en diversas condiciones. La **figura 12B** proporciona un gráfico que muestra el título del xIL4 hAb producido en diversas condiciones, y se acompaña de una transferencia de Western que muestra la expresión de FkpA.

La **figura 13** muestra la producción del xVEGFC hAb con un vector TIR2,2 en ausencia de expresión de FkpA, DsbA y DsbC (columna 1); en presencia de expresión de FkpA inducida por IPTG (columna 2); y en presencia de un plásmido con FkpA, DsbA y DsbC en ausencia de IPTG (columna 3).

La **figura 14** muestra la producción del xVEGFA IgG1 hAb con un vector TIR1,1 o TIR2,2 en ausencia de expresión de FkpA, DsbA y DsbC (1 y 3, como se etiqueta); y en presencia de un plásmido con FkpA, DsbA y DsbC en ausencia de IPTG (2 y 4, como se etiqueta).

La **figura 15** muestra la producción del xIL4 hAb con un vector TIR2,2 cuando FkpA, DsbA y DsbC se expresan a partir del mismo vector ("Individual") y cuando FkpA, DsbA y DsbC se expresan a partir de un segundo vector compatible ("Compatible"), junto con un control negativo sin el vector de expresión del anticuerpo y sin sobreexpresión de DsbA, DsbC y FkpA ("Control"). Una transferencia de Western muestra la expresión de DsbA, DsbC, y FkpA.

La **figura 16A** muestra el sistema plasmídico compatible con xIL13 que utiliza el plásmido de producción pxIL13.2.2.FkpAc13 descrito previamente y el plásmido de oxidorreductasa compatible (pJJ247). La **figura 16B** muestra la generación de un plásmido individual (MD157) que incorpora los marcos de lectura abiertos (ORF) de

pxIL13.2.2.FkpAc13 y pJJ247.

La **figura 17** muestra la producción en el tiempo de xIL13 hAb con el vector TIR2,2 cuando FkpA, DsbA y DsbC se expresan a partir del mismo vector ("Individual") y cuando DsbA y DsbC se expresan a partir de un vector compatible y FkpA se expresa a partir del vector xIL13.2.2.FkpAc13 ("Compatible"). Estos vectores utilizan un

5

promotor phoA para impulsar la expresión de FkpA. La **figura 18** muestra la velocidad promedio de consumo de oxígeno (OUR) en el tiempo en cultivos que crecen bajo una velocidad de agitación fija de células que portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa DsbA y DsbC bajo un promotor inducible por IPTG. Se muestra la OUR para cultivos desarrollados en presencia o ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

10

La **figura 19** muestra la osmolalidad promedio en cultivos desarrollados bajo una velocidad de agitación fija de células que portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa DsbA y DsbC bajo un promotor inducible por IPTG. Se muestra la osmolalidad para cultivos desarrollados en presencia o ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

15

La **figura 20** muestra el título promedio del xIL13 hAb producido en el tiempo a partir de células que portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa DsbA y DsbC bajo un promotor inducible por IPTG. Se muestra el título de anticuerpo producido para cultivos desarrollados en presencia o ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

20

La **figura 21** muestra la OUR promedio en el tiempo en cultivos desarrollados en agitación a 650 rpm durante 26 horas, a continuación se cambió a una velocidad de agitación más baja suficiente para lograr el punto de ajuste de OUR etiquetado. Las células portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa DsbA y DsbC en ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

25

La **figura 22** muestra la osmolalidad promedio en el tiempo en cultivos desarrollados en agitación a 650 rpm durante 26 horas, a continuación se cambió a una velocidad de agitación más baja suficiente para lograr el punto de ajuste de OUR etiquetado. Las células portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa en ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

30

La **figura 23** muestra el título promedio de la producción del xIL13 hAb en dos puntos de tiempo (54 y 72 horas) en cultivos desarrollados en agitación a 650 rpm durante 26 horas, a continuación se cambió a una velocidad de agitación más baja suficiente para lograr el punto de ajuste de OUR etiquetado. Las células portan dos vectores: un vector TIR2,2 que expresa el xIL13 hAb y FkpA, y un vector que expresa DsbA y DsbC en ausencia de IPTG. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

35

La **figura 24** muestra la densidad celular promedio ($DO_{550\text{ nm}}$) en el tiempo de cultivos que producen el xIL13 hAb a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante para las fases tanto de crecimiento como de producción (Tg/Tp) de 28 °C o 30 °C. Se realizó un cambio de agitación 26 horas después de la fermentación. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

40

La **figura 25** muestra la OUR promedio en el tiempo de cultivos de células que producen el hAb xIL13 a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante para las fases tanto de crecimiento como de producción (Tg/Tp) de 28 °C o 30 °C. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

45

La **figura 26** muestra la concentración promedio de fosfato en el tiempo en cultivos de células que producen el xIL13 hAb a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante para las fases tanto de crecimiento como de producción (Tg/Tp) de 28 °C o 30 °C. Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

50

La **figura 27** muestra el título promedio del xIL13 hAb producido en cultivos de células a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante para las fases tanto de crecimiento como de producción (Tg/Tp) de 28 °C o 30 °C.

55

La **figura 28** muestra la densidad celular promedio ($DO_{550\text{ nm}}$) en el tiempo de cultivos que producen el xIL13 hAb a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante de 28 °C o 30 °C (Tg/Tp 28 °C o Tg/Tp 30 °C, respectivamente), o se desarrollaron a 30 °C durante la fase de crecimiento, a continuación se cambiaron a 28 °C para la fase de producción (Tg 30 Tp 28). Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

60

La **figura 29** muestra la concentración promedio de fosfato en el tiempo en cultivos de células que producen el xIL13 hAb a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor taclI en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante de 28 °C o 30 °C (Tg/Tp 28 °C o Tg/Tp 30 °C, respectivamente), o se desarrollaron a 30 °C durante la fase de crecimiento, a continuación se cambiaron a 28 °C para la fase de producción (Tg 30 Tp). Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

65

La **figura 30** muestra la OUR en el tiempo de cultivos de células que producen el hAb xIL13 a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor

tacll en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante de 28 °C o 30 °C (Tg/Tp 28 °C o Tg/Tp 30 °C, respectivamente), o se desarrollaron a 30 °C durante la fase de crecimiento, a continuación se cambiaron a 28 °C para la fase de producción (Tg 30 Tp 28). Se proporciona el número de muestras utilizadas para cada condición ("N").

5 La **figura 31** muestra el título promedio del xIL13 hAb producido en el tiempo a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA impulsado por un promotor phoA y DsbA y DsbC impulsado por un promotor tacll en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante de 28 °C o 30 °C, como se etiquetó (Tg/Tp 28 °C o Tg/Tp 30 °C, respectivamente), o se desarrollaron a 30 °C durante la fase de crecimiento, a continuación se cambiaron a 28 °C para la fase de producción (Tg 30 Tp 28).

10 La **figura 32** muestra los resultados de un diseño de análisis experimental (DoE) factorial parcial del título de xIL13 hAb con un solo plásmido (MD157) en diferentes condiciones de proceso identificadas por el patrón en la tabla adjunta.

15 La **figura 33** muestra el título de xIL4 hAb producido a partir de un vector TIR2,2 que también codificó FkpA, DsbA y DsbC impulsado por un promotor tacll en ausencia de IPTG. Los cultivos se desarrollaron a una temperatura constante de 30 °C (Tg/Tp 30 °C), o se desarrollaron a 34 °C durante la fase de crecimiento, a continuación se cambiaron a 25 °C para la fase de producción (Tg 34 Tp 25).

La **figura 34** muestra los resultados de un análisis de diseño de experimento (DoE) factorial parcial del título de xIL17 hAb con un solo plásmido (MD341) en diferentes condiciones de proceso identificadas por el patrón en la tabla adjunta.

20 La **figura 35** muestra los efectos de optimizar primero la expresión conjunta de la proteína chaperona y a continuación optimizar las etapas de proceso (por ejemplo, velocidad de agitación, Tg y Tp) en el título de xIL13 hAb.

25 La **figura 36A** muestra el título de xIL13 hAb soluble de las fermentaciones realizadas en las cepas huésped 66F8 y 67A6. La **figura 36B** muestra las concentraciones totales de cadena ligera y cadena pesada de xIL13 a las 72 horas en las cepas huésped 66F8 y 67A6. N = 2 para ambas condiciones.

30 La **figura 37A** muestra el título de xIL4 hAb soluble de las fermentaciones realizadas en las cepas huésped 66F8 y 67A6 a una temperatura de fermentación constante. La **figura 37B** muestra el título de xIL4 hAb soluble total de las fermentaciones realizadas en las cepas huésped 66F8 y 67A6 en condiciones de fermentación empleando un cambio de temperatura. N = 2 para ambas condiciones.

La **figura 38A** muestra el título de cadena ligera de xIL4 y la **figura 38B** muestra el título de cadena pesada de xIL4 de las fermentaciones realizadas en las cepas huésped 66F8 y 67A6 en condiciones de fermentación empleando un cambio de temperatura. N = 2 para ambas condiciones.

35 La **figura 39** proporciona un mapa del plásmido de secreción de hAb xIL33. Los marcos de lectura abiertos de LC y HC se colocaron independientemente en combinación operativa con TIR2.

La **figura 40** ilustra la acumulación de xIL33 hAb en fermentaciones realizadas en ausencia de la expresión conjunta de las chaperonas DsbA, DsbC, FkpA a una temperatura constante de 30 °C (caso base), y en fermentaciones realizadas en presencia de la expresión conjunta de las chaperonas DsbA, DsbC y FkpA en las mismas condiciones de proceso (con Chaperonas).

40 La **figura 41** muestra las diferencias en el título de xIL33 hAb con respecto al Diseño de Experimento (DoE) realizado con el plásmido individual xIL33 hAb que contiene las chaperonas FkpA, DsbA, DsbC. Los factores DoE incluyeron pH, temperatura de crecimiento (Tg), temperatura de producción (Tp), y velocidad de consumo de oxígeno (OUR) objetivo de la fase de producción.

45 La **figura 42** proporciona la secuencia de nucleótidos de las variantes de secuencia señal de FkpA TIR1 (SEQ ID NO:1), TIR2 (SEQ ID NO:2) y TIR3 (SEQ ID NO:3). Se realizaron sustituciones de un solo nucleótido en la tercera posición de codones específicos y representan cambios de codones sinónimos que no alteran la secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido señal de FkpA (SEQ ID NO:4).

La **figura 43** muestra la fuerza cuantitativa de las variantes de FkpA TIR en relación con la variante de TIR1 FkpA (plásmido 19).

50 La **figura 44** muestra la acumulación del xIL13 hAb en fermentaciones realizadas con las variantes TIR de FkpA TIR1, TIR2 y TIR3. El título producido en cada condición fue de 1,5, 2,5 y 4,0 g/l para las variantes TIR1, TIR2 y TIR3, respectivamente.

La **figura 45** muestra la acumulación del xIL33 hAb en fermentaciones realizadas con las variantes TIR de FkpA TIR1, TIR2 y TIR3.

55 La **figura 46** muestra un gráfico de la acumulación del xIL17 hAb en fermentaciones realizadas con las variantes de FkpA TIR1, TIR2 y TIR3.

La **figura 47A** muestra un gráfico de la acumulación de xIL13 hAb en fermentaciones realizadas con variantes TIR de FkpA. La **figura 47B** muestra el nivel de FkpA presente en la fracción soluble del proceso de xIL13 hAb al final de la fermentación.

60 La **figura 48A** muestra las velocidades de consumo de oxígeno (OUR) para la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) alterada y las condiciones de fermentación de control. La OTR alterada y las fermentaciones de control alcanzaron una OUR máxima similar de aproximadamente 5 mmol/l/min y una OUR objetivo de cambio de agitación posterior similar de 2,75 mmol/l/min. La **figura 48B** muestra los perfiles de crecimiento para la OTR alterada y las condiciones de fermentación de control. La OTR alterada y las fermentaciones de control tuvieron perfiles de crecimiento similares y ambas alcanzaron un pico de DO₅₅₀ de 250. Mejor condición de xIL13 hAb de control (Ctrl) = 1 bar de contrapresión (BP), 20 litros estándar por minuto (SLPM), y un cambio de velocidad de agitación de 650 a 475 rpm. La condición de OTR alterada de xIL13 hAb = contrapresión de 0,3 bar, 13 SLPM, y

un cambio de velocidad de agitación de 880 a 650 rpm.

La **figura 49** muestra los perfiles de acumulación de xIL13 hAb para la OTR alterada y las condiciones de control. Las condiciones alteradas y de control tuvieron perfiles de acumulación similares durante la fermentación y ambas alcanzaron títulos promedio máximos a las 72 horas de 4,1 y 4,2 g/l, respectivamente.

Las **figuras 50A-50B** ilustran la configuración plasmídica del plásmido de producción TIR1,1 ImmTAC 1 (**figura 50A**), junto con una representación del TIR1,1 (**figura 50B**).

La **figura 51** ilustra el proceso de fermentación original (es decir, no optimizado) utilizado para producir los ImmTAC.

La **figura 52** muestra la cantidad de ImmTAC ensamblado y la cantidad total de subunidades alfa y beta acumuladas al final del proceso de fermentación.

La **figura 53** proporciona mapas plasmídicos del plásmido de producción de ImmTAC y el plásmido compatible que contiene el ORF de FkpA bajo el control de un promotor tac.

La **figura 54A** muestra las transferencias de Western anti-alfa y anti-beta reducidas solubles y solubles para las siguientes condiciones: sin chaperonas (TIR1,1), con FkpA (+FkpA), control negativo (-), y el control positivo ImmTAC 1 (ImmTAC DP). La flecha designa el ImmTAC ensamblado. La **figura 54B** muestra los títulos finales para TIR1,1 en solitario y TIR1,1 con condiciones de FkpA.

La **figura 55** ilustra las condiciones mejoradas del proceso de fermentación utilizadas para producir ImmTAC.

Las **figuras 56A-56B** muestran las transferencias de Western anti-alfa (**figura 56A**) y anti-beta (**figura 56B**) reducidas solubles y solubles para las siguientes condiciones: sin chaperonas (TIR1,1), con FkpA (+FkpA), con FkpA y las nuevas condiciones de proceso (Nuevas condiciones de proceso + FkpA), control negativo (-), y el control positivo ImmTAC 1 (ImmTAC DP).

La **figura 57** muestra el título final para las siguientes condiciones: TIR1,1; TIR1,1 con FkpA; y TIR1,1 con FkpA y las nuevas condiciones de proceso.

La **figura 58** ilustra la construcción de un único plásmido que incorpora los ORF de cadena alfa y beta de ImmTAC y el ORF de FkpA bajo el control de un promotor phoA.

La **figura 59A** muestra el título ImmTAC 1 final para los plásmidos individuales TIR1,1; TIR1,2; y TIR2,3 que incorporan el ORF de FkpA. La **figura 59B** muestra la acumulación de subunidades final de las cadenas alfa y beta de ImmTAC para los plásmidos individuales TIR1,1; TIR1,2; y TIR2,3 que incorporan el ORF de FkpA.

La **figura 60A** muestra una transferencia de Western con sonda para FkpA de fermentaciones realizadas con el plásmido de producción ImmTAC TIR1,1 y el plásmido FkpA compatible y el plásmido individual TIR1,1 que contiene el ORF de FkpA. La **figura 60B** muestra el título final para las siguientes condiciones: TIR1,1 solamente; TIR1,1 con FkpA; sistema plasmídico compatible con FkpA TIR1,1; y sistema plasmídico individual TIR1,1 FkpA.

La **figura 61** proporciona mapas plasmídicos del plásmido de producción de ImmTAC que contienen los ORF de cadena alfa y cadena beta de FkpA, y un plásmido compatible que contiene una oxidoreductasa (por ejemplo, DsbC) bajo el control de un promotor tac. La **figura 62** muestra el título final de las fermentaciones realizadas con el plásmido individual TIR1,1 que incorporó el ORF de FkpA con los plásmidos compatibles que contenían los ORF de DsbA en solitario, DsbC en solitario, o DsbA y DsbC combinados.

La **figura 63** muestra el título final de las fermentaciones realizadas con el plásmido individual TIR1,1 en solitario; el plásmido individual TIR1,1 con el plásmido compatible con DsbC; y el plásmido individual TIR2,3 con el plásmido compatible con DsbC.

La **figura 64** muestra el aumento acumulativo en el título final usando las optimizaciones anteriores, desde el plásmido de producción inicial TIR1,1 hasta el plásmido individual TIR2,3 con el plásmido compatible con DsbC.

Las **figuras 65A-65B** muestran la molécula ImmTAC 2 probada con un plásmido de producción TIR2,3 con y sin el plásmido FkpA compatible; como un solo plásmido TIR1,1 y TIR2,3 que incorpora el ORF de FkpA; y como un solo plásmido TIR1,1 y TIR2,3 que incorpora el ORF de FkpA con el plásmido DsbC compatible. Se proporcionan transferencias de Western que muestran la producción de cadenas alfa (**figura 65A**) y beta (**figura 65B**).

Descripción detallada

Los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran que la expresión conjunta de una o más proteínas chaperonas específicas en combinación con unidades de traducción que codifican cada cadena de una proteína de cadena múltiple (por ejemplo, cadena ligera y cadena pesada de un semianticuerpo) aumenta la producción de una proteína de cadena múltiple ensamblada en un sistema de células huésped procariontas. Los ejemplos demuestran además que las mejoras posteriores del proceso, tales como temperaturas específicas y velocidades de agitación para ciertas fases de la fermentación, dan como resultado mejoras significativas en la producción y robustez más allá de las mejoras del vector de expresión. En general, los métodos descritos en el presente documento logran una ganancia de al menos 10 veces en la producción de polipéptidos bicatenarios a modo de ejemplo (por ejemplo, semianticuerpo).

En un aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos para producir un polipéptido que contiene dos cadenas en una célula huésped procarionta cultivando la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, donde, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; donde la célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; y (3) una tercera unidad de traducción que codifica al menos una proteína chaperona seleccionada de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas; donde la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que incluyen: una fase de crecimiento que

incluye una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que incluye una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, donde la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción; y (b) recuperar el polipéptido biológicamente activo de la célula huésped. En un aspecto, el polipéptido consiste en dos cadenas, mientras que en otro aspecto el polipéptido comprende tres, cuatro, cinco o más cadenas.

En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos para producir un polipéptido que contiene dos cadenas en una célula huésped procariota cultivando la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, donde, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; donde la célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una primera proteína chaperona; (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una segunda proteína chaperona; y (5) una quinta unidad de traducción que codifica una tercera proteína chaperona, donde la primera, segunda y tercera proteínas chaperonas se seleccionan de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas; donde la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que incluyen: una fase de crecimiento que incluye una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que incluye una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, donde la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción; y (b) recuperar el polipéptido biológicamente activo de la célula huésped. En un aspecto, el polipéptido consiste en dos cadenas, mientras que en otro aspecto el polipéptido comprende tres, cuatro, cinco o más cadenas.

25 I. Definiciones

Antes de describir la divulgación en detalle, debe entenderse que esta divulgación no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También se comprende que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Como máximo, el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento en referencia a un valor, abarca del 90 % al 110 % de ese valor (por ejemplo, la fuerza de traducción relativa de una primera y segunda TIR de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 se refiere a un valor relativo fuerza de traducción en el intervalo de entre 0,9 y 3,3).

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la divulgación descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

El término "polipéptido que comprende dos cadenas" (los términos "proteína bicatenaria" y "polipéptido bicatenario" también pueden usarse indistintamente en el presente documento), como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a cualquier polipéptido que contenga más de una cadena polipeptídica distinta. En algunas realizaciones, una proteína bicatenaria puede incluir un complejo macromolecular de dos o más polipéptidos unidos entre sí a través de uno o más enlaces intermoleculares, incluyendo, sin limitación, un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, una proteína bicatenaria puede incluir un único polipéptido con secuencias de aminoácidos pertenecientes a dos cadenas polipeptídicas distintas (por ejemplo, una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo) unidas por un enlazador polipeptídico. En este caso, una proteína bicatenaria puede representar físicamente una cadena sencilla, pero dos o más porciones de la cadena sencilla pueden comportarse funcionalmente como si fueran dos cadenas de proteína separadas. Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario puede incluir una cadena pesada funcional y una cadena ligera funcional que, aunque están unidas por un enlazador polipeptídico, no obstante se pliegan y se ensamblan como si fueran polipéptidos separados asociados solo por enlaces intermoleculares (por ejemplo, uno o más enlaces disulfuro).

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son aptos para la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero).

Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y de este modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada.

El término "cistrón", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un elemento genético ampliamente equivalente a una unidad de traducción que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica y regiones de control adyacentes. Un "cistrón" puede incluir, por ejemplo, uno o más marcos de lectura abierta, una región de inicio de la traducción (TIR; como se define a continuación en el presente documento), una secuencia señal y una región de terminación.

Un vector de expresión "policistrónico" se refiere a un vector individual que contiene y expresa múltiples cistrones bajo el control regulador de un único promotor. Un ejemplo común de vector policistrónico es un vector "dicistrónico" que contiene y expresa dos polipéptidos diferentes bajo el control de un promotor. Tras la expresión de un vector dicistrónico o policistrónico, primero se transcriben múltiples genes como una única unidad transcripcional y, a continuación, se traducen por separado.

Una "unidad transcripcional" se refiere a un polinucleótido que se transcribe como una única transcripción de ARN. Una "unidad de traducción" se refiere a un segmento de un polinucleótido que codifica y, cuando se traduce, produce un polipéptido. Como se ha descrito anteriormente, un polinucleótido policistrónico puede contener una única unidad transcripcional con múltiples unidades de traducción.

Un vector de expresión de "cistrón separado" de acuerdo con la presente divulgación se refiere a un único vector que comprende al menos dos pares de promotor-cistrón separados, en los que cada cistrón está bajo el control de su propio promotor. Tras la expresión de un vector de expresión de cistrón separado, los procesos tanto de transcripción como de traducción de diferentes genes son separados e independientes.

Una "proteína chaperona", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína que facilite el plegamiento o ensamblaje de otras macromoléculas, incluyendo, sin limitación, proteínas bicatenarias. Generalmente, las proteínas chaperonas pueden actuar mediante muchos mecanismos diferentes para promover el plegamiento o ensamblaje de proteínas. Por ejemplo, las proteínas chaperonas pueden promover el plegamiento y/o ensamblaje de proteínas, catalizar la formación de enlaces disulfuro intracatenarios, promover el desplegamiento y/o desensamblaje de proteínas (por ejemplo, de proteínas agregadas o mal plegadas o complejos multiproteicos), prevenir la agregación, facilitar la degradación de proteínas, etc.

La "región de inicio de la traducción" o TIR, o región de inicio de la traducción, o secuencia de inicio de la traducción, como se usan en el presente documento, se refieren a una región de ácido nucleico que proporciona la eficiencia del inicio de la traducción de un gen de interés. En general, una TIR dentro de un cistrón particular abarca el sitio de unión al ribosoma (RBS) y las secuencias 5' y 3' con respecto al RBS. El RBS se define para contener, como mínimo, la región de Shine-Dalgarno y el codón de inicio (AUG). Por consiguiente, una TIR también incluye al menos una porción de la secuencia de ácido nucleico a traducir. Preferentemente, una TIR de la divulgación incluye una secuencia señal de secreción que codifica un péptido señal que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada dentro de un cistrón. Una variante de TIR contiene variantes de secuencia (particularmente sustituciones) dentro de la región TIR que alteran la propiedad de la TIR, tal como su fuerza de traducción, como se define a continuación en el presente documento. Preferentemente, una variante de TIR de la divulgación contiene sustituciones de secuencia dentro de los primeros 2 a aproximadamente 14, preferentemente aproximadamente 4 a 12, más preferentemente aproximadamente 6 codones de la secuencia señal de secreción que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada dentro de un cistrón.

El término "fuerza de traducción", como se usa en el presente documento, se refiere a una medición de un polipéptido secretado en un sistema de control en el que se usa una o más variantes de una TIR para dirigir la secreción de un polipéptido, y los resultados se comparan con la TIR de tipo natural o algún otro control en las mismas condiciones de cultivo y ensayo. Sin quedar limitado a ninguna teoría, la "fuerza de traducción", como se usa en el presente documento, puede incluir, por ejemplo y sin limitación, una medida de la estabilidad del ARNm, la eficiencia de la unión del ribosoma al sitio de unión al ribosoma, etc.

"Secuencia señal de secreción" o "secuencia señal" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal corto que puede usarse para dirigir una proteína de interés recién sintetizada a través de una membrana celular, usualmente la membrana interna o la membrana tanto interna como externa de los procariotas. Como tal, la proteína de interés, tal como el polipéptido de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, se secreta en el periplasma de las células huésped procariotas o en el medio de cultivo. El péptido señal codificado por la secuencia señal de secreción puede ser endógeno a las células huésped, o puede ser exógeno, incluyendo péptidos señal nativos del polipéptido a expresar. Las secuencias señal de secreción están presentes normalmente en el extremo amino de un

polipéptido a expresar, y normalmente se eliminan enzimáticamente entre la biosíntesis y la secreción del polipéptido del citoplasma. Por lo tanto, el péptido señal no suele estar presente en un producto proteico maduro.

5 "Unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia unida. Generalmente, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están "unidas operativamente" son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas o en el caso de un líder secretor, contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, aunque un promotor unido operativamente se localiza generalmente 10 aguas arriba de la secuencia codificante, no está necesariamente contiguo a ella. Los potenciadores unidos operativamente pueden localizarse aguas arriba, dentro o aguas abajo de las secuencias codificantes y a distancias considerables del promotor. La unión se logra mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR, por hibridación, o por ligadura en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo 15 con la práctica convencional.

Los "elementos reguladores", como se usan en el presente documento, se refieren a secuencias de nucleótidos presentes en cis, necesarias para la transcripción y traducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo en polipéptidos. Los elementos reguladores de la transcripción comprenden normalmente un promotor 5' 20 de la secuencia génica a expresar, sitios de inicio y terminación de la transcripción, y secuencia señal de poliadenilación. El término "sitio de inicio de la transcripción" se refiere al ácido nucleico en la construcción correspondiente al primer ácido nucleico incorporado en el transcrito primario, es decir, el precursor de ARNm; el sitio de inicio de la transcripción puede solaparse con las secuencias promotoras.

25 Un "promotor" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que controla la transcripción de un gen o secuencia a la que está unida operativamente. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Los promotores utilizados serán funcionales en el tipo de célula de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada. Un gran número de promotores que incluyen promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de diversas fuentes diferentes, se conocen bien en la técnica (y se identifican en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Con promotores inducibles, la actividad del promotor aumenta o disminuye en respuesta a una señal, por ejemplo, la presencia de IPTG o la depleción de fosfato. 30

35 El término "célula huésped" (o "célula huésped recombinante"), como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una célula que ha sido alterada genéticamente, o que es capaz de ser alterada genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula precursora, pero aun así se incluyen dentro 40 del alcance de la expresión "célula huésped", como se usa en el presente documento.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que sea eficaz la actividad biológica del principio activo y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se vaya a administrar la formulación. Dichas formulaciones son estériles. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un mamífero objeto para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado. 45

Un "sujeto" o un "individuo" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. 50

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, en tanto que muestren la actividad biológica deseada. 55

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando, por ejemplo, tinción azul de Coomassie o plateada. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes ya que al menos un 60 65

componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

- 5 Los "anticuerpos nativos" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.
- 10
- 15 El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} (colectivamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.
- 20 La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse " V_H ". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse " V_L ". Estos dominios generalmente son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.
- 25 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones estructurales" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- 30
- 35 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (" κ ") y lambda (" λ "), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- 40 El término "isotipo" o "subclase" de IgG, como se usa en el presente documento, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes.
- 45 En función de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA_1 , e IgA_2 . Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , γ , ϵ , μ y δ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se han descrito generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al.* Cellular and Mol. Immunology, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes.
- 50
- 55 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpos como se define más adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.
- 60 Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.
- 65 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión a antígeno. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos

Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

5 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

10 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación fuerte no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se puede unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir
15 un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

20 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en los que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.
25 Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv
30 comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos
35 comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Se describen diacuerpos de manera más completa en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).
40

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a
45 partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que la naturaleza del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la
50 secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la
55 secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno.
60 Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en cuando a que normalmente no están contaminadas con otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos
65 sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la divulgación pueden producirse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, la expresión en una célula huésped procarionte, el

método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véanse, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las Pat. de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véanse, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATTZED® en los que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden efectuar para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las Pat. de EE.UU. N.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido fabricado usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir también usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Para la preparación de anticuerpos monoclonales también se dispone de los métodos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición a antígenos, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenoratos inmunizados (véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 6.075.181 y 6.150.584 referentes a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006), que se refiere a anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (por ejemplo, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su

afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humanizado o humano.

5 La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV" cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis CDR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único en conferir una especificidad delicada a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

15 Están en uso varias delimitaciones de HVR y se abarcan en el presente documento. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Tabla 1a. Regiones hipervariables de anticuerpos

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

25 Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *anteriormente*, para cada una de estas definiciones.

30 Los residuos de "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de HVR como se define en el presente documento.

35 El término "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *anteriormente*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

45 El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat *et al.*, *anteriormente*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humano.

50 La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los

anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

II. Optimización molecular

5 Se divulgan en el presente documento métodos para producir un polipéptido que contiene dos cadenas en una célula huésped procariota cultivando la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, donde, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; donde la célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; y (3) una tercera unidad de traducción que codifica al menos una proteína chaperona seleccionada de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas. También se describen en el presente documento métodos para producir un polipéptido que contiene dos cadenas en una célula huésped procariota cultivando la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, donde, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped; donde la célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una primera proteína chaperona; (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una segunda proteína chaperona; y (5) una quinta unidad de traducción que codifica una tercera proteína chaperona, donde la primera, segunda y tercera proteínas chaperonas se seleccionan de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas.

En algunos casos, se cultiva una célula huésped para expresar las dos cadenas de un polipéptido, donde, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped. Como se usa en el presente documento, el plegamiento y ensamblaje de dos cadenas puede referirse a cualquiera o todas las etapas que promueven la adopción final de la conformación de proteínas bicatenarias tridimensional adecuada, el ensamblaje de proteínas bicatenarias, o ambos. El plegamiento y ensamblaje puede referirse al plegamiento y ensamblaje de cada cadena en su conformación y plegamiento adecuados, o puede referirse al plegamiento y ensamblaje del complejo creado por el enlace intermolecular de dos cadenas de proteínas. De manera similar, cada cadena puede plegarse y ensamblarse para formar un polipéptido biológicamente activo, o el complejo creado por el enlace intermolecular de dos cadenas de proteínas puede plegarse y ensamblarse para formar, en su conjunto, un polipéptido biológicamente activo.

Un polipéptido biológicamente activo puede referirse a cualquier polipéptido que sea capaz de realizar una función atribuida al polipéptido. Las funciones de los polipéptidos biológicamente activos pueden incluir, sin limitación, un plegamiento o ensamblaje apropiados, una unión u otra interacción con otra macromolécula, y actividad enzimática. A modo de ilustración, un anticuerpo biológicamente activo puede referirse a un anticuerpo que es capaz de realizar al menos una función atribuida a los anticuerpos, incluyendo, sin limitación, la unión a un epítipo o poseer una propiedad de una región Fc de anticuerpo, como se describe con más detalle a continuación.

40 **Proteínas chaperonas**

En algunos casos, un polinucleótido de la presente divulgación contiene una unidad de traducción que codifica al menos una proteína chaperona. Como se ha descrito anteriormente, una proteína chaperona puede referirse a cualquier proteína que ayude en el plegamiento o ensamblaje de otras macromoléculas, incluyendo, sin limitación, proteínas bicatenarias. Los ejemplos de proteínas chaperonas pueden incluir, sin limitación, peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y proteínas de choque térmico (tales como proteínas Hsp60, Hsp70, Hsp90, y Hsp100). Las proteínas chaperonas también pueden facilitar el transporte de proteínas a través de las membranas, por ejemplo, la translocación de cadenas polipeptídicas a través de la membrana plasmática o la membrana del retículo endoplásmico.

En algunos casos, una proteína chaperona puede ser una peptidil-prolil isomerasa. La peptidil-prolil isomerasa (los términos "prolil isomerasa", "rotamasa" y "PPiase" pueden usarse indistintamente en el presente documento) puede referirse a cualquier enzima que catalice la interconversión de isómeros cis y trans de enlaces prolina o prolil-iminopéptido. El número EC para esta reacción es EC 5.2.1.8. Cualquier proteína conocida o que se predice que cataliza la reacción descrita por este número EC puede ser una peptidil-prolil isomerasa de la presente divulgación. La actividad peptidil-prolil isomerasa también puede describirse por la identificación del término GO GO: 0003755. Cualquier proteína conocida o que se predice que posee la función molecular descrita por esta identificación del término GO puede ser una peptidil-prolil isomerasa de la presente divulgación.

La actividad peptidil-prolil isomerasa es conocida en la técnica por promover el plegamiento y el ensamblaje de proteínas. En algunas realizaciones, las peptidil-prolil isomerasas pueden facilitar el plegamiento y ensamblaje de proteínas convirtiendo enlaces trans prolilo en enlaces cis prolilo para proteínas cuya estructura correctamente plegada incluye un enlace cis prolilo. También se sabe que algunas peptidil-prolil isomerasas potencian el plegamiento y el ensamblaje de proteínas que carecen de enlaces cis prolilo (Bothmann H y Pluckthun A 2000 J. Biol. Chem. 275:17100). En algunas realizaciones, las peptidil-prolil isomerasas pueden facilitar el plegamiento de proteínas y el ensamblaje de proteínas que carecen de enlaces cis prolilo. Por lo tanto, aunque la actividad peptidil-prolil isomerasa

puede servir como una característica funcional para identificar una proteína chaperona útil para los métodos descritos en el presente documento, la utilidad de una peptidil-prolil isomerasa no se limita necesariamente a su actividad catalítica *per se*.

- 5 En la invención, la peptidil-prolil isomerasa es una proteína FkpA. En algunas realizaciones, la proteína FkpA es FkpA de *E. coli*. Una FkpA de *E. coli* puede referirse a cualquier polipéptido codificado por un gen *fkpA* en cualquier cepa o aislado de bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*. En algunas realizaciones, FkpA de *E. coli* se refiere a una proteína codificada por un gen *fkpA* descrito por el Número de Acceso EcoGene EG12900. En algunas realizaciones, FkpA de *E. coli* se refiere a una proteína que tiene la secuencia descrita por el Número de Acceso NCBI RefSeq
10 NP_417806.

Se conocen en la técnica otras proteínas FkpA. Ejemplos de proteínas FkpA pueden incluir, sin limitación, peptidil-propil isomerasa de *S. boydii* (NCBI RefSeq N.º WP_000838252), peptidil-propil isomerasa de *C. youngae* (NCBI RefSeq N.º WP_006687366), peptidil-propil isomerasa de *K. oxytoca* (NCBI RefSeq N.º WP_004125943), peptidil-propil isomerasa de *S. enterica* (NCBI RefSeq N.º WP_000838233), peptidil-propil isomerasa de *K. pneumoniae* (NCBI RefSeq N.º WP_019704642), FPR3p de *S. cerevisiae* (NCBI RefSeq N.º NP_013637), Fkpb1a de *M. musculus* (NCBI RefSeq N.º NP_032045), Fkpb2 de *M. musculus* (NCBI RefSeq N.º NP_032046), FKBP2 de *H. sapiens* (NCBI RefSeq N.º NP_001128680), y CG14715 de *D. melanogaster* (NCBI RefSeq N.º NP_650101). En algunos casos, una proteína FkpA de la presente divulgación tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al
15 menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al
20 menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad con FkpA de *E. coli*.

En algunos casos, una proteína chaperona puede ser una proteína disulfuro oxidoreductasa. La proteína disulfuro oxidoreductasa (los términos "proteína disulfuro isomerasa" y "tiol-disulfuro isomerasa" pueden usarse indistintamente
30 en el presente documento) puede referirse a cualquier enzima que catalice la transposición de enlaces disulfuro en proteínas. Por ejemplo, una proteína disulfuro oxidoreductasa puede catalizar la oxidación de cisteínas para formar enlaces disulfuro en proteínas. Una proteína disulfuro oxidoreductasa también puede catalizar la isomerización de enlaces disulfuro mal emparejados en proteínas. El número EC para esta reacción es EC 5.3.4.1. Cualquier proteína conocida o que se predice que cataliza la reacción descrita por este número EC puede ser una proteína disulfuro oxidoreductasa de la presente divulgación. La actividad de la proteína disulfuro oxidoreductasa también puede describirse por la identificación del término GO GO: 0015035. Cualquier proteína conocida o que se predice que posee la función molecular descrita por esta identificación del término GO puede ser una proteína disulfuro oxidoreductasa de la presente divulgación.

40 La actividad de la proteína disulfuro oxidoreductasa es conocida en la técnica por promover el plegamiento y ensamblaje de proteínas. Por ejemplo, la actividad de la proteína disulfuro oxidoreductasa promueve la formación de enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares adecuados durante el plegamiento y ensamblaje de proteínas. En particular, la actividad de la proteína disulfuro oxidoreductasa es importante para las proteínas con enlaces disulfuro que se expresan en el periplasma de las células procariontas.

45 En algunos casos, la proteína disulfuro oxidoreductasa es una proteína DsbA. En algunos casos, la proteína DsbA es DsbA de *E. coli*. Una DsbA de *E. coli* puede referirse a cualquier polipéptido codificado por un gen *dsbA* en cualquier cepa o aislado de bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*. En algunos casos, DsbA de *E. coli* se refiere a una proteína codificada por un gen *dsbA* descrito por el Número de Acceso EcoGene EG11297. En algunos casos, DsbA de *E. coli* se refiere a una proteína que tiene la secuencia descrita por el Número de Acceso NCBI RefSeq NP_418297.

Se conocen en la técnica otras proteínas DsbA. Ejemplos de proteínas DsbA pueden incluir, sin limitación, tiol-disulfuro isomerasa de *S. flexneri* (NCBI RefSeq N.º WP_000725335), tiol-disulfuro isomerasa de *S. dysenteriae* (NCBI RefSeq N.º WP_000725348), tiol-disulfuro isomerasa de *C. youngae* (NCBI RefSeq N.º WP_006686108), y tiol-disulfuro isomerasa de *S. enterica* (NCBI RefSeq N.º WP_023240584). En algunos casos, una proteína DsbA de la presente divulgación tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad con DsbA de *E. coli*.

65 En la invención, la proteína disulfuro oxidoreductasa es una proteína DsbC. En algunas realizaciones, la proteína DsbC es DsbC de *E. coli*. Una DsbC de *E. coli* puede referirse a cualquier polipéptido codificado por un gen *dsbC* en

cualquier cepa o aislado de bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*. En algunas realizaciones, DsbC de *E. coli* se refiere a una proteína codificada por un gen *dsbC* descrito por el Número de Acceso EcoGene EG11070. En algunas realizaciones, DsbC de *E. coli* se refiere a una proteína que tiene la secuencia descrita por el Número de Acceso NCBI RefSeq NP_417369.

5 Se conocen en la técnica otras proteínas DsbC. Ejemplos de proteínas DsbC pueden incluir, sin limitación, proteína-disulfuro isomerasa de *S. sonnei* (NCBI RefSeq N.º WP_000715206), proteína-disulfuro isomerasa de *S. dysenteriae* (NCBI RefSeq N.º WP_000715209), proteína-disulfuro isomerasa de *E. fergusonii* (NCBI RefSeq N.º WP_000715225), proteína de intercambio de tiol-disulfuro DsbC de *S. bongori* (NCBI RefSeq N.º WP_020845161), y proteína disulfuro isomerasa DsbC de *S. enterica* (NCBI RefSeq N.º WP_023183515). En algunos casos, una proteína DsbC de la presente divulgación tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad con DsbC de *E. coli*.

20 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines comparativos óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines comparativos). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 50 %, normalmente al menos un 75 %, e incluso más normalmente al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o un 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico).

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Cuando se comparan dos secuencias para determinar la identidad, no es necesario que las secuencias sean contiguas, pero cualquier hueco conllevaría una penalización que reduciría el porcentaje total de identidad. Para blastn, los parámetros predeterminados son penalización de apertura por hueco = 5, y penalización de extensión por hueco = 2. Para blastp, los parámetros predeterminados son penalización de apertura por hueco = 11, y penalización de extensión por hueco = 1.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, usualmente, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar utilizando algoritmos conocidos (por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv Appl Math, 2:482, 1981; por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J Mol Biol, 48:443, 1970; por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988; mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information), GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual.

60 Un ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988; y Pearson, Methods Enzymol, 266:227-258, 1996). Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTA de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad están optimizados, Matriz BL50 15:-5, k-tupla = 2; penalización de unión = 40, optimización = 28; penalización por hueco -12, penalización por longitud de hueco = -2; y ancho = 16.

65 Otro ejemplo preferido de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud

de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, Nuc Acids Res, 25:3389-3402, 1977; y Altschul *et al.*, J Mol Biol, 215:403-410, 1990, respectivamente). Se usan BLAST y BLAST 2.0, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la divulgación. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincide o satisface algún valor umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina como el umbral del valor de palabra adyacente. Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo el tiempo que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (valor de penalización para restos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el valor de alineación acumulada queda fuera por una cantidad X de su valor máximo obtenido; el valor acumulado llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-5787, 1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y muy preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por pares para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También traza un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva (Feng y Doolittle, J Mol Evol, 35:351-360, 1987), empleando un método similar a un método publicado (Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. A continuación, este grupo se alinea con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una serie de alineaciones progresivas por pares. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para las regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco predeterminado (3,00), peso y longitud de hueco predeterminados (0,10) y huecos finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de software de análisis de secuencia GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux *et al.*, Nuc Acids Res, 12:387-395, 1984).

Otro ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos y ADN es el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, Nucl Acids. Res, 22:4673-4680, 1994). ClustalW realiza múltiples comparaciones por pares entre grupos de secuencias y las ensambla en una alineación múltiple basada en la homología. Las penalizaciones de hueco abierto y extensión por hueco fueron 10 y 0,05 respectivamente. Para alineaciones de aminoácidos, el algoritmo BLOSUM puede usarse como una matriz de peso de proteína (Henikoff y Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915-10919, 1992).

Vectores y casetes de expresión

En algunos casos, una célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; y (3) una tercera unidad de traducción que codifica al menos una proteína chaperona seleccionada de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidoreductasas, y combinaciones de las mismas. En algunos casos, una célula huésped contiene un polinucleótido que incluye (1) una primera unidad de traducción que codifica una primera cadena del polipéptido; (2) una segunda unidad de traducción que codifica una segunda cadena del polipéptido; (3) una tercera unidad de traducción que codifica una primera proteína chaperona; (4) una cuarta unidad de traducción que codifica una segunda proteína chaperona; y (5) una quinta unidad de traducción que codifica

una tercera proteína chaperona, donde la primera, segunda y tercera proteínas chaperonas se seleccionan de peptidil-prolil isomerasas, proteínas disulfuro oxidorreductasas, y combinaciones de las mismas. Es un descubrimiento de la presente divulgación que se puede lograr una mayor producción de proteínas bicatenarias correctamente plegadas y ensambladas utilizando un sistema plasmídico individual (es decir, un solo polinucleótido que contiene unidades de traducción que codifican cada cadena de la proteína bicatenaria y una o más unidades de traducción que codifican una o más proteínas chaperonas) o un sistema plasmídico compatible (es decir, un primer polinucleótido que contiene unidades de traducción que codifican cada cadena de la proteína bicatenaria y un segundo polinucleótido que contiene una o más unidades de traducción que codifican una o más proteínas chaperonas).

En algunas realizaciones, el polinucleótido contiene además tres copias de un promotor, en el que una primera copia está en combinación operativa con la primera unidad de traducción, una segunda copia está en combinación operativa con la segunda unidad de traducción, y una tercera copia está en combinación operativa con la tercera unidad de traducción para impulsar la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína chaperona. En algunas realizaciones, dos de las unidades de traducción que codifican dos de las tres proteínas chaperonas son parte de una única unidad de traducción. En algunas realizaciones, el polinucleótido contiene además un promotor en combinación operativa con cada unidad de traducción.

En algunas realizaciones, el promotor es un promotor inducible. Como se ha descrito anteriormente, la actividad de un promotor inducible aumenta o disminuye en respuesta a una señal. Por ejemplo, un promotor inducible puede promover la transcripción en respuesta a la presencia de una señal, tal como IPTG. Un promotor inducible puede promover la transcripción en respuesta a la ausencia de una señal, tal como fosfato. En cualquiera de estos escenarios, la cantidad de transcripción puede o no ser proporcional a la cantidad de señal, o la deficiencia de la misma. En la técnica se conocen numerosos ejemplos de promotores inducibles adecuados para células huésped procariotas. Estos pueden incluir, sin limitación, los promotores *lac*, *tac*, *trc*, *trp*, *pho*, *recA*, *tetA*, *nar*, el fago *P_L*, *cspA*, *T7*, y *P_{BAD}* (véase Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:211 para una descripción más detallada). En algunas realizaciones, se usan tres copias de un promotor inducible para impulsar la expresión de unidades de traducción separadas, por ejemplo, ambas cadenas de una proteína bicatenaria y una proteína chaperona, de manera coordinada.

En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor inducible por IPTG. Un promotor inducible por IPTG puede referirse a cualquier secuencia de polinucleótidos que promueva la transcripción de una manera que responda al isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) o cualquier otro derivado de lactosa que sea capaz de promover la transcripción del operón *lac* (por ejemplo, alolactosa). Se conocen en la técnica muchos ejemplos de promotores inducibles por IPTG, incluyendo, sin limitación, promotores *tac* (por ejemplo, *tacl*, *tacll*, etc.), promotores *lac*, y derivados de los mismos (por ejemplo, *lacUV5*, *taclac*, etc.).

En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor inducible por IPTG que impulsa la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína chaperona. Es un descubrimiento sorprendente de la presente divulgación que un promotor inducible por IPTG que regula la expresión de una proteína chaperona puede promover, sin inducción por IPTG, la expresión de la proteína chaperona a un nivel que promueve un título de producto más alto, en comparación con la expresión de la proteína chaperona cuando el promotor inducible por IPTG es inducido por IPTG.

En algunas realizaciones, el promotor inducible es un promotor *pho* que impulsa la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína chaperona cuando el fosfato en el medio de cultivo se ha agotado. Un promotor *pho* puede referirse a cualquier secuencia de polinucleótidos que promueva la transcripción de una manera que responda al fosfato extracelular (por ejemplo, fosfato inorgánico). Por ejemplo, el regulón de fosfato (*Pho*) en *E. coli* incluye componentes proteicos que detectan el fosfato extracelular y, en respuesta a los niveles de fosfato, regulan la expresión de numerosos genes aguas abajo a través de los promotores *Pho* (véanse Hsieh YJ y Wanner BL 2010 Curr. Opin. Microbiol. 13(2):198 para una descripción más detallada). Cuando se desarrollan bacterias en un medio de cultivo, se sabe que la expresión de este regulón *Pho* se reprime cuando el fosfato (por ejemplo, fosfato inorgánico, *P_i*) está disponible en el medio y se induce cuando el fosfato se ha agotado. Un ejemplo no limitante de un promotor *pho* usado en los métodos descritos en el presente documento es el promotor *phoA* de *E. coli*. Este promotor es ampliamente conocido y se usa en la técnica para regular la expresión de proteínas recombinantes en células huésped procarióticas de una manera que depende de la concentración de fosfato en el medio de cultivo celular (véase Lubke C *et al.* 1995 Enzyme Microb. Technol. 17(10):923 para una descripción más detallada).

En algunas realizaciones, el polinucleótido contiene además un marcador seleccionable y el medio de cultivo incluye un agente de selección con un único antibiótico para hacer que la célula huésped conserve el polinucleótido. De manera ventajosa, los métodos descritos en el presente documento permiten la producción de las cadenas de una proteína bicatenaria con la expresión conjunta de una o más proteínas chaperonas, de modo que las unidades de traducción que codifican cada uno de estos componentes están incluidas en un solo polinucleótido (por ejemplo, un plásmido de expresión o un sistema plasmídico individual como se describe en el presente documento). La ventaja de tal sistema es que, dado que todos estos componentes están codificados por el mismo plásmido, solo se requiere un marcador seleccionable para el mantenimiento de estos polinucleótidos en una célula huésped procariota.

Un marcador seleccionable puede referirse a cualquier polinucleótido que codifica una proteína que promueve la

supervivencia de una célula huésped cuando la célula se somete a selección, es decir, cualquier condición utilizada para aumentar preferentemente la abundancia de células que llevan un marcador seleccionable en relación con la abundancia de células que carecen del marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables son genes que promueven la supervivencia de la célula huésped en presencia de un antibiótico. Se conocen en la técnica numerosos marcadores seleccionables y agentes de selección correspondientes con antibióticos individuales. Por ejemplo, y sin limitación, muchos marcadores seleccionables y los antibióticos correspondientes se describen y mencionan en Jang CW y Magnuson T 2013 PLoS ONE 8(2):e57075. En algunas realizaciones, un marcador seleccionable puede referirse a un gen (por ejemplo, un gen expresado a partir de un plásmido) que complementa la delección de un gen presente dentro del genoma de la célula huésped. En estos ejemplos, cuando la célula se somete a selección (es decir, crecimiento en una condición que requiere la actividad del gen eliminado del genoma huésped), la copia del gen suministrada por el plásmido complementa la deficiencia del genoma huésped, seleccionando así una o más células que portan el gen complementario exógeno. Dichos genes pueden incluir marcadores auxotróficos o genes necesarios para producir un nutriente específico que falta en un medio celular, cuyos ejemplos se describen más detalladamente en el presente documento. A continuación se describen con más detalle varios marcadores seleccionables y antibióticos a modo de ejemplo.

En algunas realizaciones, la primera unidad de traducción incluye una primera región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la primera cadena, y la segunda unidad de traducción incluye una segunda región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la segunda cadena. Se sabe que las regiones de inicio de la traducción (TIR) son importantes para la traducción de proteínas recombinantes en células huésped procariontas (véanse, por ejemplo, Simmons LC y Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 y Vimberg V *et al.* 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). Una TIR puede determinar la eficiencia de traducción de una unidad de traducción. Una TIR incluye normalmente características de la unidad de traducción tal como el codón de inicio, la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), y potenciadores de la traducción. Una TIR puede incluir además una secuencia señal de secreción que codifica un péptido señal. La secuencia y el espaciado entre las características de una TIR pueden regular la eficiencia del inicio de la traducción.

En algunas realizaciones, la fuerza de traducción relativa de la primera y segunda TIR es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0. En el presente documento se describen vectores que incluyen unidades de traducción que codifican cada cadena de una proteína bicatenaria, y cada unidad de traducción puede incluir una TIR. Como se usa en el presente documento, "fuerza de traducción" puede referirse a la producción de un polipéptido a través de la traducción de una unidad de traducción. Esta producción puede depender de una serie de características, incluyendo, sin limitación, traducción del ARNm, estabilidad del ARNm, eficiencia de unión ribosómica a un ARNm, y el plegamiento, ensamblaje y/o translocación de un polipéptido codificado por el mismo. La fuerza de traducción relativa puede referirse a la producción de un polipéptido codificado por una unidad de traducción con una TIR específica o experimental, en comparación con la producción de un polipéptido codificado por una unidad de traducción con una TIR de tipo natural o de control, cuando tanto la TIR experimental como la TIR de control se expresan mediante una célula huésped procarionta similar (por ejemplo, del mismo género y especie) cultivada en las mismas condiciones. Se puede encontrar una descripción más detallada de las TIR en la Patente de EE.UU. Número 8.361.744.

40 **Polipéptidos recombinantes**

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para producir polipéptidos con dos cadenas. De manera ventajosa, los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para promover la expresión, el plegamiento y el ensamblaje de muchos tipos diferentes de proteínas, particularmente aquellas con enlaces disulfuro, tales como proteínas bicatenarias como se ha descrito anteriormente. A continuación se describen proteínas bicatenarias particulares, pero los métodos descritos en el presente documento no se limitan a estas realizaciones particulares. Como se usa en el presente documento, las proteínas bicatenarias pueden incluir proteínas que contienen más de una cadena polipeptídica distinta. Aunque muchas realizaciones descritas en el presente documento implican proteínas bicatenarias con dos cadenas polipeptídicas, se contemplan proteínas bicatenarias con más de dos cadenas polipeptídicas (por ejemplo, tres o más polipéptidos) y se pueden producir mediante los métodos descritos en el presente documento. Como se ha descrito anteriormente, también se contemplan proteínas bicatenarias hechas de una sola cadena polipeptídica que de otra manera se asocian como lo harían si fueran dos cadenas polipeptídicas distintas (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos variables monocatenarios, y similares) y pueden producirse mediante los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, las dos cadenas de un polipéptido bicatenario de la presente divulgación están unidas entre sí mediante al menos un enlace disulfuro. Los enlaces disulfuro pueden referirse a cualquier enlace covalente que une dos grupos tiol. Los enlaces disulfuro en los polipéptidos se forman normalmente entre los grupos tiol de los residuos de cisteína. Se sabe en la técnica que los enlaces disulfuro polipeptídicos son importantes para el plegamiento y ensamblaje de muchos polipéptidos, tales como proteínas bicatenarias de la presente divulgación. Los enlaces disulfuro polipeptídicos pueden incluir enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en una sola cadena polipeptídica (es decir, enlaces disulfuro intramoleculares o intracatenarios). Los enlaces disulfuro polipeptídicos también pueden incluir enlaces disulfuro entre residuos de cisteína que se encuentran en cadenas polipeptídicas separadas (es decir, enlaces disulfuro intermoleculares o intercatenarios). Por lo tanto, en algunas realizaciones, dos cadenas de un polipéptido bicatenario están unidas entre sí mediante al menos un enlace disulfuro.

Se sabe en la técnica que los enlaces disulfuro son importantes para el plegamiento y ensamblaje de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Se sabe que los diferentes isótopos de anticuerpos y las diferentes subclases dentro de un isótopo poseen diferentes patrones de enlaces disulfuro. Por ejemplo, los anticuerpos IgG pueden contener 12 enlaces disulfuro intracatenarios, un enlace disulfuro intercatenario entre cada cadena ligera y su correspondiente cadena pesada, y entre 2 y 11 enlaces disulfuro intercatenarios entre cadenas pesadas, dependiendo de la subclase de IgG particular (véanse Liu H y May K 2012 MAbs. 4(1):17 para una descripción más detallada). También se sabe que IgM (véanse, por ejemplo, Wiersma EJ y Shulman MJ 1995 J. Immunol. 154(10):5265), IgE (véase, por ejemplo, Helm BA *et al.* 1991 Eur. J. Immunol. 21(6):1543), IgA (véase, por ejemplo, Chintalacharuvu KR *et al.* 2002 J. Immunol. 169(9):5072), e IgD (véase, por ejemplo, Shin SU *et al.* 1992 Hum. Antibodies Hybridomas 3(2):65) forman enlaces disulfuro durante el plegamiento y el ensamblaje.

En algunos casos, un polipéptido bicatenario de la presente divulgación es heterólogo a la célula huésped. Como se usa en el presente documento, un polipéptido heterólogo cuando se usa en referencia a una célula huésped puede referirse a cualquier polipéptido que no se exprese endógenamente en la célula huésped, es decir, cuando la célula huésped está aislada de la naturaleza. Un polipéptido heterólogo también puede referirse a un polipéptido que puede ser expresado endógenamente por la célula huésped, pero que se expresa bajo una regulación diferente que cuando la célula huésped está aislada de la naturaleza. Los ejemplos de regulación diferente pueden incluir, sin limitación, una cantidad diferente de expresión, expresión en respuesta a un estímulo diferente, o cualquier otro contexto de expresión alterado, tal como mediante el uso de un promotor heterólogo, tal como un promotor inducible.

En algunos casos, un polipéptido bicatenario de la presente divulgación es un monómero de un heterodímero. Como se usa en el presente documento, un heterodímero puede referirse a cualquier complejo polipeptídico que contenga dos polipéptidos o complejos polipeptídicos distintos en un enlace operativo. Un ejemplo no limitante de un heterodímero es un anticuerpo biespecífico o bivalente compuesto por dos monómeros de anticuerpo distintos (es decir, un par de cadena ligera-cadena pesada en un enlace operativo). En este ejemplo, el plegamiento y el ensamblaje de un primer par de cadena pesada-cadena ligera que reconoce un primer antígeno produce un primer monómero de anticuerpo. El plegamiento y el ensamblaje de un segundo par de cadena pesada-cadena ligera que reconoce un segundo antígeno producen un segundo monómero de anticuerpo. Estos monómeros se pueden ensamblar por cualquier medio conocido en la técnica (descrito a continuación con más detalle con respecto a los anticuerpos biespecíficos) para formar un heterodímero. Para obtener más detalles sobre un ejemplo ilustrativo de formación de anticuerpos heterodiméricos, véase Ridgway JBB *et al.* 1996 Protein Eng. 9(7):617.

En algunos casos, un polipéptido bicatenario de la presente divulgación es un anticuerpo monovalente en el que la primera cadena y la segunda cadena representan una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo monovalente puede referirse a cualquier complejo polipeptídico elaborado a partir de una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo operativamente unidas entre sí para formar un par de cadena pesada-cadena ligera en el que el par de cadena pesada-cadena ligera no está unido operativamente a un segundo par de cadena pesada-cadena ligera. El término "semianticuerpo (hAb)" puede usarse indistintamente en el presente documento.

En algunos casos, un anticuerpo monovalente de la presente divulgación es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Como se usan en el presente documento, los términos "se une", "se une específicamente a un", o es "específico para" se refieren a interacciones medibles y reproducibles tales como la unión entre una diana (es decir, y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a o se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de la que se une a otras dianas. En un caso, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a la diana según se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos casos, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertos casos, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro caso, se puede incluir la unión específica, pero no requiere, la unión exclusiva.

En algunos casos, un polipéptido bicatenario de la presente divulgación es una proteína secretora. Como se usa en el presente documento, una proteína secretora puede referirse a cualquier proteína que es secretada por una célula huésped en el periplasma de la célula huésped o en el medio extracelular. Una proteína secretora puede ser una proteína que es secretada endógenamente por una célula huésped, o una proteína secretora puede ser una proteína que no es secretada endógenamente por una célula huésped pero que está modificada de tal manera que promueve su secreción. Por ejemplo, la presencia de una secuencia señal, que se encuentra normalmente en el extremo N-terminal de un polipéptido, puede dirigir un polipéptido a la ruta secretora para su secreción. Se conocen en la técnica numerosas secuencias señal y pueden ser útiles para promover la secreción de una proteína secretora o permitir la secreción de una proteína que no es secretada naturalmente por una célula huésped; véase, por ejemplo, Picken *et al.*, Infect. Immun. 42:269-275 (1983); Simmons y Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996); y Humphreys DP *et al.* 2000 Protein Expr. Purif. 20(2):252. Un ejemplo no limitante de una secuencia señal es una secuencia señal de enterotoxina II termoestable (STII).

En la invención, el polipéptido bicatenario es un receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC). ImmTAC puede referirse a una proteína de fusión que combina un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-CD3 (o un fragmento de anticuerpo análogo que se une a un linfocito T y activa una respuesta de linfocitos T) con un receptor de linfocitos T monoclonal soluble (TCR). En algunas realizaciones, un TCR monoclonal soluble de un ImmTAC puede diseñarse para que posea una mayor afinidad por un antígeno particular, en comparación con la afinidad por el antígeno de un TCR que no ha sido genomanipulado (por ejemplo, un TCR de origen natural). Los ImmTAC pueden usarse para una serie de aplicaciones, incluyendo, sin limitación, la activación de una respuesta de linfocitos T contra una célula, tal como una célula tumoral, que presenta el antígeno afín reconocido por el ImmTAC. En algunas realizaciones, el TCR monoclonal soluble comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR y un dominio variable de cadena beta de TCR. En algunas realizaciones, el TCR monoclonal soluble comprende además un dominio constante de cadena alfa de TCR y un dominio constante de cadena beta de TCR unido por un enlace disulfuro nativo o no nativo. Para una descripción más detallada de ImmTAC, véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.569.664; Liddy *et al.*, Nat. Med. 18:908-7 (2012); y Oates y Jakobsen, Oncolmunology 2:e22891 (2013).

En algunas realizaciones, una proteína secretora de la presente divulgación se recupera del periplasma de la célula huésped. Se conoce en la técnica que el periplasma se refiere al espacio entre la membrana interna o citoplasmática y la membrana externa de una célula bacteriana gramnegativa. Sin desear quedar ligado a la teoría, se piensa que el periplasma es un entorno oxidante que favorece la formación de enlaces disulfuro. Por lo tanto, puede ser ventajoso localizar un polipéptido con enlaces disulfuro como parte de su estructura correctamente plegada y ensamblada (por ejemplo, una proteína bicatenaria de la presente divulgación) en el periplasma (véase Schlapschy M *et al.* 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385 para una descripción más detallada).

Se conocen en la técnica numerosos métodos para recuperar una proteína periplásmica. Un ejemplo no limitante de purificación a gran escala de proteínas periplásmicas se describe en la Patente Europea N.º EP1356052 B1 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Las proteínas periplásmicas pueden recuperarse extrayendo una fracción periplásmica de una preparación de esferoblastos (véase, por ejemplo, Schlapschy M *et al.* 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385). Una vez que se ha generado un extracto periplásmico, las proteínas periplásmicas pueden purificarse mediante cualquier técnica estándar de purificación de proteínas conocida en la técnica, tal como purificación por afinidad, cromatografía y similares.

Anticuerpos

Las proteínas bicatenarias descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Una clase a modo de ejemplo de proteínas bicatenarias es el anticuerpo. Como se describe a continuación, los anticuerpos se preparan usando técnicas disponibles en la técnica para generar anticuerpos, cuyos métodos a modo de ejemplo se describen con más detalle en las siguientes secciones. Un experto en la técnica reconocerá que muchos de los métodos descritos a continuación se pueden aplicar a proteínas bicatenarias distintas de los anticuerpos.

El anticuerpo se dirige contra un antígeno de interés (por ejemplo, y sin limitación, PD-L1 (como un PD-L1 humano), HER2, o CD3 (tal como un CD3 humano), IL13, IL4, VEGFC, VEGFA, y VEGF). Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero.

En ciertos casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En un caso, la Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión a la solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante una noche placas multipocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente $23 \text{ }^\circ\text{C}$). En una placa no adsorbente (Nunc N.º 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] con diluciones seriadas de un Fab de interés. A continuación, el Fab de interés se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. En lo sucesivo, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden $150 \mu\text{l/pocillo}$ de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos

o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro caso, la K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en -10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriadas de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensoactivo de polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación ($k_{\text{asociación}}$) y las tasas de disociación ($k_{\text{disociación}}$) se calculan usando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (Software de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (K_d) se calcula como la relación $k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

(i) Preparación de antígenos

Se pueden usar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden usar como inmunógeno fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor). Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana pueden usarse como inmunógeno. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) Ciertos métodos basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina de bovino, o un inhibidor de la tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después se estimula a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después los animales se sangran y el suero se evalúa para el título de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en un cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. Además, se usan de forma adecuada agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

Los anticuerpos monoclonales de la divulgación se pueden hacer utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) sobre hibridomas humano-humano. Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. N.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humano (tecnología de Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005). Una vez que se han aislado los anticuerpos monoclonales deseados de los hibridomas, los polinucleótidos que los codifican pueden subclonarse en un vector de expresión procariota y los anticuerpos pueden producirse mediante expresión en una célula huésped procariótica mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

(iii) Anticuerpos derivados de bibliotecas

Los anticuerpos de la divulgación pueden aislarse mediante detección sistemática de bibliotecas combinatorias respecto de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica diversos métodos para generar bibliotecas de presentación en fagos y para la detección sistemática de dichas bibliotecas respecto de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas tales como los métodos descritos en el Ejemplo 3. Se revisan métodos adicionales, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de presentación en fagos, se clonan por separado repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en fagotecas, que posteriormente pueden someterse a detección sistemática respecto de fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos normalmente presentan fragmentos de anticuerpo, ya sea en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o en forma de fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratar se puede clonar (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también pueden producirse sintéticamente bibliotecas sin exposición previa clonando segmentos de gen V no reorganizados de células madre y usando cebadores para la PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen fagotecas de anticuerpo humano incluyen, por ejemplo: la Patente de EE.UU. N.º 5.750.373, y las Publicaciones de Patente de EE.UU. N.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpo humanas se consideran en el presente documento anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

(iv) Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos

En ciertos casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En ciertos casos, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, CDR, (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano, y los FR (o porciones de los mismos) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los residuos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para producirlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las Patentes de EE.UU. N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen un injerto SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe la "modificación de la superficie"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36: 43-60 (2005) (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen la estrategia de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones marco humanas que pueden usarse para humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones marco de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y

regiones marco procedentes de la detección sistemática de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

En ciertos casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos, de manera general, en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008). Los anticuerpos humanos se pueden preparar, por ejemplo y sin limitación, mediante la expresión en una célula huésped procariota a partir de un vector de expresión procariota mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

También pueden generarse anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable de clon de Fv seleccionadas entre bibliotecas de presentación en fago de origen humano. Posteriormente, pueden combinarse dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

(v) Fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias, existen ventajas derivadas del uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos citadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida *in vivo* aumentada que comprende residuos del epítipo de unión al receptor de rescate se describen en la patente de EE.UU. N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En ciertos casos, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las Pat. de EE.UU. N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para la unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *anteriormente*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, en los que los epítopos son usualmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos epítopos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos inespecíficos están abarcados por esta expresión cuando se usan en el presente documento. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que usualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Un enfoque conocido en la técnica para fabricar anticuerpos biespecíficos es el enfoque de "botón en ojal" o "protuberancia en cavidad" (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.731.168). En este enfoque, dos polipéptidos de inmunoglobulina (por ejemplo, polipéptidos de cadena pesada) comprenden cada uno una interfaz. Una interfaz de un polipéptido de inmunoglobulina interactúa con una interfaz correspondiente en el otro polipéptido de inmunoglobulina, permitiendo así que se asocien los dos polipéptidos de inmunoglobulina. Estas interfaces pueden diseñarse de manera

que un "botón" o "protuberancia" (estos términos se pueden usar indistintamente en el presente documento) situados en la interfaz de un polipéptido de inmunoglobulina se corresponde con un "ojal" o "cavidad" (estos términos se pueden usar indistintamente en el presente documento) situados en la interfaz del otro polipéptido de inmunoglobulina. En algunos casos, el ojal es de tamaño idéntico o similar al del botón y está adecuadamente posicionado de manera que cuando las dos interfaces interactúan, el botón de una interfaz se puede posicionar en el ojal correspondiente de la otra interfaz. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que esto estabiliza el heteromultímero y favorece la formación del heteromultímero sobre otras especies, por ejemplo, homomultímeros. En algunos casos, este enfoque puede usarse para promover la heteromultimerización de dos polipéptidos de inmunoglobulina diferentes, creando un anticuerpo biespecífico que comprende dos polipéptidos de inmunoglobulina con especificidades de unión para diferentes epítomos.

En algunos casos, se puede construir un botón reemplazando una cadena lateral de aminoácidos pequeña con una cadena lateral más grande. En algunos casos, se puede construir un ojal reemplazando una cadena lateral de aminoácidos grande con una cadena lateral más pequeña. Pueden existir botones u ocales en la interfaz original, o pueden introducirse sintéticamente. Por ejemplo, los botones u ocales se pueden introducir sintéticamente alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la interfaz para reemplazar al menos un residuo de aminoácido "original" con al menos un residuo de aminoácido "importado". Los métodos para alterar secuencias de ácidos nucleicos pueden incluir técnicas de biología molecular estándar bien conocidas en la técnica. Los volúmenes de la cadena lateral de diversos residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla. En algunos casos, los residuos originales tienen un volumen de cadena lateral pequeño (por ejemplo, alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina), y los residuos importados para formar un botón son aminoácidos de origen naturales y pueden incluir arginina, fenilalanina, tirosina y triptófano. En algunos casos, los residuos originales tienen un gran volumen de cadena lateral (por ejemplo, arginina, fenilalanina, tirosina y triptófano), y los residuos importados para formar un ojal son aminoácidos de origen natural y pueden incluir alanina, serina, treonina y valina.

Tabla 1b. Propiedades de los residuos de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Masa ^a (daltons)	Volumen ^b (Å ³)	Área superficial accesible ^c (Å ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160
Ácido aspártico (Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido glutámico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210
Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptófano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155

^aPeso molecular del aminoácido menos el del agua. Valores de Handbook of Chemistry and Physics, 43^a ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.
^bValores de A.A. Zamyatin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.
^cValores de C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. El área superficial accesible se define en las figuras 6-20 de esta referencia.

En algunos casos, los residuos originales para formar un botón o un ojal se identifican basándose en la estructura tridimensional del heteromultímero. Las técnicas conocidas en la técnica para obtener una estructura tridimensional pueden incluir cristalografía de rayos X y RMN. En algunos casos, la interfaz es el dominio CH3 de un dominio constante de inmunoglobulina. En estos casos, la interfaz CH3/CH3 de la IgG₁ humana implica dieciséis residuos en cada dominio ubicado en cuatro hebras β antiparalelas. Sin desear quedar ligado a la teoría, los residuos mutados se

ubican preferentemente en las dos hebras β antiparalelas centrales para minimizar el riesgo de que el disolvente circundante pueda alojar los botones, en lugar de los ojales compensatorios en el dominio CH3 asociado. En algunos casos, las mutaciones que forman botones y ojales correspondientes en dos polipéptidos de inmunoglobulina corresponden a uno o más pares proporcionados en la siguiente tabla.

5

Tabla 2. Conjuntos a modo de ejemplo de mutaciones formadoras de botones y ojales correspondientes

CH3 de la primera inmunoglobulina	CH3 de la segunda inmunoglobulina
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

Las mutaciones se representan mediante el residuo original, seguido de la posición que utiliza el sistema de numeración de Kabat, y a continuación el residuo importado (todos los residuos se dan en un código de aminoácidos de una sola letra). Las mutaciones múltiples están separadas por dos puntos.

En algunos casos, un polipéptido de inmunoglobulina comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2 anterior. En algunos casos, un anticuerpo biespecífico comprende un primer polipéptido de inmunoglobulina que comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la columna izquierda de la Tabla 2, y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos correspondientes enumeradas en la columna de la derecha de la Tabla 2.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Después de la mutación del ADN como se ha analizado anteriormente, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de inmunoglobulina modificados con una o más mutaciones formadoras de botones u ojales correspondientes pueden expresarse y purificarse usando técnicas recombinantes estándar y sistemas celulares conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; 7.642.228; 7.695.936; 8.216.805; la Pub. de EE.UU. N.º 2013/0089553; y Spiess *et al.*, Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013. Pueden producirse polipéptidos de inmunoglobulina modificados usando células huésped procariontas, tal como *E. coli*. Los polipéptidos de inmunoglobulina portadores de botones y ojales correspondientes pueden expresarse en células huésped en cocultivo y purificarse juntos como un heteromultímero, o pueden expresarse en cultivos individuales, purificarse por separado, y ensamblarse *in vitro*. En algunos casos, dos cepas de células huésped bacterianas (una que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un botón, y la otra que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un ojal) se cultivan conjuntamente usando técnicas de cultivo bacteriano estándar conocidas en la técnica. En algunos casos, las dos cepas se pueden mezclar en una relación específica, por ejemplo, para lograr niveles de expresión iguales en cultivo. En algunos casos, las dos cepas se pueden mezclar en una relación de 50:50, 60:40 o 70:30. Después de la expresión del polipéptido, las células se pueden lisar juntas, y se puede extraer la proteína. Las técnicas estándar conocidas en la técnica que permiten medir la abundancia de especies homo-multiméricas frente a hetero-multiméricas pueden incluir cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos casos, cada polipéptido de inmunoglobulina modificado se expresa por separado usando técnicas recombinantes estándar, y pueden ensamblarse juntos *in vitro*. El ensamblaje se puede lograr, por ejemplo, purificando cada polipéptido de inmunoglobulina modificado, mezclándolos e incubándolos juntos en una masa equivalente, reduciendo los disulfuros (por ejemplo, por tratamiento con ditiotreitól), concentrando y reoxidando los polipéptidos. Los anticuerpos biespecíficos formados se pueden purificar usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de intercambio catiónico y se pueden medir usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño. Para una descripción más detallada de estos métodos, véase Spiess *et al.*, Nat Biotechnol 31:753-8, 2013. En algunos casos, los polipéptidos de inmunoglobulina modificados pueden expresarse por separado en células CHO y ensamblarse *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es típico tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se transfecta simultáneamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones

no son de significancia particular.

En un ejemplo de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO/94/04690. Para más detalles acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos dirijan células del sistema inmunitario a células no deseadas (Pat. de EE.UU. N.º 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la Pat. de EE.UU. N.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Se han descrito también en la bibliografía las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden estar químicamente acoplados para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')₂ específico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (scFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol*, 152:5368 (1994).

Otra técnica para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos es el enfoque de "acoplador de linfocitos T biespecíficos" o BiTE® (véase, por ejemplo, los documentos WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261, y WO2008/119567). Este enfoque utiliza dos dominios variables de anticuerpos dispuestos en un solo polipéptido. Por ejemplo, una sola cadena polipeptídica incluye dos fragmentos Fv monocatenarios (scFv), cada uno con un dominio de cadena pesada variable (V_H) y un dominio de cadena ligera variable (V_L) separados por un enlazador polipeptídico de una longitud suficiente para permitir la asociación intramolecular entre los dos dominios. Este único polipéptido

incluye además una secuencia espaciadora de polipéptidos entre los dos fragmentos scFv. Cada scFv reconoce un epítipo diferente, y estos epítipos pueden ser específicos para diferentes tipos de células, de manera que las células de dos tipos de células diferentes se acercan o se unen cuando cada scFv se acopla con su epítipo análogo. Un ejemplo particular de este enfoque incluye un scFv que reconoce un antígeno de superficie celular expresado por una célula inmunitaria, por ejemplo, un polipéptido CD3 en un linfocito T, unido a otro scFv que reconoce un antígeno de superficie celular expresado por una célula diana, tal como una célula neoplásica o tumoral.

Dado que es un polipéptido único, el acoplador de linfocitos T biespecíficos puede expresarse usando cualquier sistema de expresión de células procariotas conocido en la técnica. Sin embargo, pueden ser necesarias técnicas de purificación específicas (véase, por ejemplo, documento EP1691833) para separar los acopladores de linfocitos T biespecíficos monoméricos de otras especies multiméricas, que pueden tener actividades biológicas distintas de la actividad pretendida del monómero. En un esquema de purificación a modo de ejemplo, una solución que contiene polipéptidos secretados se somete primero a una cromatografía de afinidad por metales, y los polipéptidos se eluyen con un gradiente de concentraciones de imidazol. Este eluato se purifica adicionalmente usando cromatografía de intercambio aniónico, y los polipéptidos se eluyen usando un gradiente de concentraciones de cloruro de sodio. Por último, este eluato se somete a cromatografía de exclusión por tamaño para separar los monómeros de las especies multiméricas.

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tuft *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

En algunos casos, la proteína bicatenaria es parte de un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo biespecífico puede contener dos o más anticuerpos monovalentes de la presente divulgación.

En algunos casos, el primer dominio de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada, en los que los uno o más dominios constantes de cadena pesada se seleccionan entre un primer dominio CH1 (CH₁), un primer dominio CH2 (CH₂), un primer dominio CH3 (CH₃); y el segundo dominio de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada, en los que los uno o más dominios constantes de cadena pesada se seleccionan entre un segundo dominio CH1 (CH₁), un segundo dominio CH2 (CH₂), y un segundo dominio CH3 (CH₃). En algunos casos, al menos uno de los uno o más dominios constantes de cadena pesada del primer dominio de unión a antígeno se empareja con otro dominio constante de cadena pesada del segundo dominio de unión a antígeno. En algunos casos, cada uno de los dominios CH₃ y CH₃ comprenden una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o la cavidad en el dominio CH₃ puede posicionarse en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₃. En algunos casos, los dominios CH₃ y CH₃ se encuentran en una interfaz entre dicha protuberancia y cavidad. En la Tabla 2 del presente documento se muestran conjuntos a modo de ejemplo de sustituciones de aminoácidos en los dominios CH₃ y CH₃. En algunos casos, cada uno de los dominios CH₂ y CH₂ comprenden una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o la cavidad en el dominio CH₂ puede posicionarse en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₂. En algunos casos, los dominios CH₂ y CH₂ se encuentran en una interfaz entre dicha protuberancia y cavidad. En algunos casos, el dominio CH₃ y/o CH₃ de una IgG contienen una o más sustituciones de aminoácidos en los residuos seleccionados del grupo que consiste en 347, 349, 350, 351, 366, 368, 370, 392, 394, 395, 398, 399, 405, 407, y 409 de acuerdo con la numeración de aminoácidos que se muestra en la figura 5 de la Pat. de EE.UU. N.º 8.216.805. En algunos casos, la protuberancia comprende uno o más residuos introducidos seleccionados del grupo que consiste en un residuo de arginina (R), un residuo de fenilalanina (F), un residuo de tirosina (Y), y un residuo de triptófano (W). En algunas realizaciones, la cavidad comprende uno o más residuos introducidos seleccionados del grupo que consiste en un residuo de alanina (A), un residuo de serina (S), un residuo de treonina (T), y un residuo de valina (V). En algunos casos, los dominios CH₃ y/o CH₂ son de una IgG (por ejemplo, subtipo IgG1, subtipo IgG2, subtipo IgG2A, subtipo IgG2B, subtipo IgG3, o subtipo IgG4). En algunos casos, un dominio CH₃ del anticuerpo biespecífico comprende la sustitución de aminoácidos T366Y, y el otro dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos Y407T. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos T366W, y el otro dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos Y407A. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos F405A, y el otro dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos T394W. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos T366Y y F405A, y el otro dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos T394W e Y407T. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos T366W y F405W, y el otro dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos T394S e Y407A. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos F405W y Y407A, y el otro dominio CH₃ comprende sustituciones de aminoácidos T366W e T394S. En algunos casos, un dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos F405W, y el otro dominio CH₃ comprende la sustitución de aminoácidos T394S. Las mutaciones se representan mediante el residuo original, seguido de la posición utilizando el sistema de numeración de Kabat, y a continuación los residuos importados. Véase también la numeración en la figura 5 de la Pat. de EE.UU. N.º 8.216.805.

(vii) Anticuerpos de dominio único

En algunos casos, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único

es una cadena polipeptídica única que comprende la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos casos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 6.248.516 B1). En un caso, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

(viii) Variantes de anticuerpos

En algunos casos, se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza la secuencia.

(ix) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En ciertos casos, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones a modo de ejemplo", y como se describen más adelante en referencia a las clases de las cadenas laterales de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos pueden someterse a detección sistemática respecto de una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida, o CCDA o CDC mejoradas.

Tabla 3. Sustituciones a modo de ejemplo.

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- a. hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b. hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c. ácidos: Asp, Glu;

d. básicos: His, Lys, Arg;

e. residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

5 f. aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 Un tipo particular de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas para su estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo precursor y/o tendrán determinadas propiedades biológicas conservadas del anticuerpo precursor. Una variante sustitucional a modo de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación de fagos, tales como aquellas descritas en el presente documento. Brevemente, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan sobre fagos y se someten a detección sistemática de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

20 Pueden efectuarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden efectuarse en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutación con elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), evaluándose la afinidad de unión de la VH o VL variante resultante. La maduración por afinidad mediante la construcción y reelección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, barajado de cadenas, o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Después, se crea una biblioteca secundaria. Posteriormente, se somete la biblioteca a detección sistemática para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a las HVR, en las que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Pueden identificarse específicamente residuos de HVR implicados en la unión al antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado de barrido de alanina. Normalmente se usan como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

35 En ciertos casos, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR en tanto que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras, tal como se proporcionan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de HVR o SDR. En ciertos casos de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está o bien no alterada o contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

45 Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden someterse a detección sistemática para determinar si contienen las propiedades deseadas.

55 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud, desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C-terminal del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

60 (x) Variantes de la región Fc

65 En ciertos casos, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertos casos, la divulgación contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que la hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que es importante la semivida del anticuerpo *in vivo* mientras que ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales.

5 Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos a receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de actividad de unión a FcγR (por tanto, careciendo probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan Fc (RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, California; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como se divulga en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por tanto, carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y de depuración/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con la sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de EE.UU. N.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (Patente de EE.UU. N.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR. (Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312, y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En ciertos casos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En un caso a modo de ejemplo, el anticuerpo comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en su región Fc: S298A, E333A, y K334A.

En algunos casos, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551, el documento WO 99/51642, e Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas que tienen sustituciones en uno o más de los siguientes residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (Patente de EE.UU. N.º 7.371.826). Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la Patente de EE.UU. N.º 5.648.260; la Patente de EE.UU. N.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en referencia a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

(xi) Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la divulgación se pueden modificar adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. En ciertas realizaciones, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de

etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

(xii) Vectores, células huésped y métodos recombinantes

También se pueden producir anticuerpos usando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-antígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la divulgación puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (por ejemplo, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II termoestable.

(b) Origen de la replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para diversas células huésped procariotas. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas.

(c) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicho uso de selección dominante usan los medicamentos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro esquema de selección usa una célula huésped procariota con una deleción cromosómica que elimina un gen cuyo producto génico es esencial para el crecimiento en un medio de cultivo particular. En estos ejemplos, las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo que complementa la deleción cromosómica de la célula huésped sobrevivirán cuando se cultiven en el medio de cultivo particular. Los ejemplos de genes útiles en estos esquemas pueden incluir genes marcadores auxotróficos u otros genes que se requieren para generar un nutriente esencial cuando la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo particular.

(d) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación generalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas

bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica un anticuerpo.

(e) Componente de la región de inicio de la traducción

5 Como se ha descrito anteriormente, se sabe que las regiones de inicio de la traducción (TIR) son importantes para la traducción de proteínas recombinantes en células huésped procariotas (véanse, por ejemplo, Simmons LC y Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 y Vimberg V *et al.* 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). Una TIR puede determinar la eficiencia de traducción de una unidad de traducción. Una TIR incluye normalmente características de la unidad de traducción tal como el codón de inicio, la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), y potenciadores de la traducción. Una TIR puede incluir además una secuencia señal de secreción que codifica un péptido señal. La secuencia y el espaciado entre las características de una TIR pueden regular la eficiencia del inicio de la traducción. Para descripciones adicionales de los usos de las TIR en la producción de proteínas, véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de inicio de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción.

(f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en las células huésped procariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. En las células procariotas, los terminadores pueden incluir terminadores dependientes de Rho o independientes de Rho. Un ejemplo de un terminador útil en células huésped procariotas incluye, sin limitación, el terminador λ t0 (Scholtissek y Grosse, Nucleic Acids Res. 15:3185, 1987).

III. Optimización del proceso

25 En el presente documento se proporcionan métodos para producir un polipéptido que contiene dos cadenas en una célula huésped procariota cultivando la célula huésped para expresar las dos cadenas del polipéptido, en los que, tras la expresión, las dos cadenas se pliegan y se ensamblan para formar un polipéptido biológicamente activo en la célula huésped, en los que la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que incluyen: una fase de crecimiento que incluye una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción que incluye una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción, en los que la temperatura de crecimiento es de 2 a 10 °C por encima de la temperatura de producción, y la velocidad de agitación del crecimiento es de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción. Es un descubrimiento sorprendente de la presente divulgación que ciertas optimizaciones del proceso de producción tienen un aumento drástico en el rendimiento de proteínas bicatenarias, como lo demuestran los datos descritos en el presente documento.

(g) Selección y transformación de células huésped

40 Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a células huésped procariotas. Los procariotas adecuados para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgación en DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537), y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

50 En algunos casos, la célula huésped procariota es una bacteria gramnegativa. La bacteria gramnegativa se refiere a cualquier bacteria que contenga una membrana externa que rodee la capa de peptidoglicano detectada por tinción de Gram. Se conocen en la técnica muchas células huésped bacterianas gramnegativas. Por ejemplo, se sabe que las bacterias gramnegativas incluyen, sin limitación, proteobacterias, tales como *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Zetaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, y *Acidobacteria*; cianobacterias; y espiroquetas. Las bacterias gramnegativas bien conocidas pueden incluir especies de géneros tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Heliobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, y *Klebsiella*.

60 En la invención, la bacteria gramnegativa es *E. coli*. Como se usa en el presente documento, *E. coli* puede referirse a cualquier cepa o aislado de bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*. *E. coli* puede incluir cepas de origen natural o cepas que han sido modificadas genéticamente, tal como por mutación o transformación con un plásmido como se describe en el presente documento.

65 En algunas realizaciones, una *E. coli* de la presente divulgación es de una cepa deficiente en actividad proteasa endógena. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que las cepas deficientes en actividad de proteasa endógena pueden permitir una producción mejorada de proteínas recombinantes, tales como las proteínas periplásmicas de la presente divulgación, porque algunas proteasas endógenas tienen actividad contra sustratos expresados de manera recombinante (véanse Baneyx F y Georgiu G 1990 J. Bacteriol. 172(1):491 para un ejemplo de este tipo). Las cepas

deficientes en actividad de proteasa endógena pueden incluir cepas en las que un gen que codifica una proteasa endógena se muta, se elimina o se inactiva de otro modo. Los ejemplos de dichos genes pueden incluir, sin limitación, *degP*, *prc*, y *ompT*. Los métodos para introducir mutaciones en una amplia variedad de células huésped procarióticas (por ejemplo, para genomanipular cepas deficientes en actividad proteasa endógena) se conocen bien en la técnica; véase, por ejemplo, Snyder L *et al.* 2013 *Molecular Genetics of Bacteria* 4^a ed. ASM Press).

Se pueden producir proteínas bicatenarias tales como anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí sola muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.648.237 (Carter *et al.*), Pat. de EE.UU. N.º 5.789.199 (Joly *et al.*), Pat. de EE.UU. N.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de inicio de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Chariton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse, por ejemplo, a través de una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede realizar de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Las células huésped se transforman con los vectores de clonación o expresión descritos anteriormente para la producción de proteínas bicatenarias y se cultivan en un medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(h) Cultivo de las células huésped

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren al cultivo de una célula huésped en un medio de cultivo en condiciones que incluyen una fase de crecimiento y una fase de producción. Cada una de estas fases puede referirse además a las condiciones en las que la célula huésped crece durante la fase particular. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, una fase de crecimiento puede incluir una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y una fase de producción puede incluir una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción.

Una fase de crecimiento puede referirse a cualquier momento durante el cual un cultivo de células huésped está creciendo exponencialmente. La temperatura de crecimiento, como se usa en el presente documento, puede referirse a la temperatura de un medio de cultivo que contiene una célula huésped de la presente divulgación durante una fase de crecimiento de la célula huésped. Se puede determinar una fase de crecimiento de un cultivo de células huésped mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica, por ejemplo, midiendo la densidad óptica del cultivo (por ejemplo, a una longitud de onda de aproximadamente 550 nm, aproximadamente 600 nm, o una longitud de onda intermedia) en el tiempo y determinando en qué momento cesa la fase de crecimiento exponencial. Si una célula huésped contiene un vector con un promotor *pho*, una fase de crecimiento puede referirse a cualquier momento durante el cual un cultivo de células huésped está creciendo exponencialmente y la concentración de fosfato en el medio de cultivo es suficiente para prevenir la inducción de la transcripción génica mediada por el promotor *pho*.

Una fase de producción puede referirse a cualquier momento durante el cual un cultivo de células huésped está produciendo un producto. La temperatura de producción, como se usa en el presente documento, puede referirse a la temperatura de un medio de cultivo que contiene una célula huésped de la presente divulgación durante una fase de producción de la célula huésped. Si una célula huésped contiene un vector con un promotor *pho* que impulsa la expresión de un producto, una fase de producción puede referirse a cualquier momento durante el cual la concentración de fosfato en el medio de cultivo sea suficientemente baja para inducir la transcripción génica del producto mediada por *pho*.

En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una temperatura de crecimiento de 2 °C a 10 °C por encima de la temperatura de producción. En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una temperatura de crecimiento de 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C por encima de la temperatura de producción. En algunos casos, la temperatura de crecimiento está por encima de la temperatura de producción en menos de aproximadamente cualquiera de las siguientes cantidades (en °C): 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, o 2,5. En algunos casos, la temperatura de crecimiento está por encima de la temperatura de producción en más de aproximadamente cualquiera de las siguientes cantidades (en °C): 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, o 9,5. Es decir, la temperatura de crecimiento está por encima de la temperatura de producción en cualquiera de un intervalo de cantidades (en °C) con un límite superior de 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, o 2,5 y un límite inferior seleccionado independientemente de 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, o 9,5, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En la invención, la temperatura de crecimiento está en el intervalo de 30 °C a 34 °C durante la fase de crecimiento. En algunas realizaciones, la temperatura de crecimiento es aproximadamente 30 °C, aproximadamente 30,5 °C,

aproximadamente 31 °C, aproximadamente 31,5 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 32,5 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 33,5 °C, o aproximadamente 34 °C durante la fase de crecimiento. En algunos casos, la temperatura de crecimiento durante la fase de crecimiento es menor de aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 34, 33,5, 33, 32,5, 32, 31,5, 31, o 30,5. En algunos casos, la temperatura de crecimiento durante la fase de crecimiento es mayor de aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, o 33,5. Es decir, la temperatura de crecimiento durante la fase de crecimiento puede ser cualquiera de un intervalo de temperaturas (en °C) con un límite superior de 34, 33,5, 33, 32,5, 32, 31,5, 31, o 30,5 y un límite inferior seleccionado independientemente de 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, o 33,5, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En la invención, la temperatura de producción está en el intervalo de 25 °C a 29 °C durante la fase de producción. En algunas realizaciones, la temperatura de producción es aproximadamente 25 °C, aproximadamente 25,5 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 26,5 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 27,5 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 28,5 °C, o aproximadamente 29 °C durante la fase de producción. En algunos casos, la temperatura de producción durante la fase de producción es menor de aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 29, 28,5, 28, 27,5, 27, 26,5, 26, o 25,5. En algunos casos, la temperatura de producción durante la fase de producción es mayor de aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, o 28,5. Es decir, la temperatura de producción durante la fase de producción puede ser cualquiera de un intervalo de temperaturas (en °C) con un límite superior de 29, 28,5, 28, 27,5, 27, 26,5, 26, o 25,5 y un límite inferior seleccionado independientemente de 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, o 28,5, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

Una velocidad de agitación se refiere a la velocidad a la que se agita un cultivo celular (por ejemplo, mediante agitación). La velocidad de agitación del crecimiento como se usa en el presente documento puede referirse a la velocidad a la que se agita un cultivo que contiene una célula huésped de la presente divulgación durante una fase de crecimiento de la célula huésped. La velocidad de agitación de producción, como se usa en el presente documento, puede referirse a la velocidad a la que se agita un cultivo que contiene una célula huésped de la presente divulgación durante una fase de producción de la célula huésped. Los cultivos celulares se pueden agitar para mantener la aireación del cultivo celular.

En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento de 50 a 250 rpm por encima de la velocidad de agitación de producción. En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento de 50 rpm, 75 rpm, 100 rpm, 125 rpm, 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm, 225 rpm, o 250 rpm por encima de la agitación de producción. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento está por encima de la velocidad de agitación de producción en menos de aproximadamente cualquiera de las siguientes tasas (en rpm): 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, o 75. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento está por debajo de la velocidad de agitación de la producción en más de aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades (en rpm): 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, o 225. Es decir, la velocidad de agitación del crecimiento está por encima de la velocidad de agitación de producción en cualquiera de un intervalo de velocidades (en rpm) con un límite superior de 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100 o 75 y un límite inferior seleccionado independientemente de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 o 225, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento está en el intervalo de aproximadamente 600 a 800 rpm durante la fase de crecimiento. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento es de aproximadamente 600 rpm, aproximadamente 625 rpm, aproximadamente 650 rpm, aproximadamente 675 rpm, aproximadamente 700 rpm, aproximadamente 725 rpm, aproximadamente 750 rpm, aproximadamente 775 rpm, o aproximadamente 800 rpm durante la fase de crecimiento. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento es menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades (en rpm): 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, o 625. En algunos casos, la velocidad de agitación del crecimiento es mayor de aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades (en rpm): 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, o 775 durante la fase de crecimiento. Es decir, la velocidad de agitación del crecimiento durante la fase de crecimiento es cualquiera de un intervalo de velocidades (en rpm) con un límite superior de 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650 o 625 y un límite inferior seleccionado independientemente de 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750 o 775, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunos casos, la velocidad de agitación de producción está en el intervalo de aproximadamente 300 a 500 rpm durante la fase de producción. En algunos casos, la velocidad de agitación de producción durante la fase de producción es aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 325 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 375 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 425 rpm, aproximadamente 450 rpm, aproximadamente 475 rpm, o aproximadamente 500 rpm. En algunos casos, la velocidad de agitación de producción durante la fase de producción es menor de aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades (en rpm): 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, o 325. En algunos casos, la velocidad de agitación de producción durante la fase de producción es mayor de aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades (en rpm): 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, o 475. Es decir, la velocidad de agitación de producción durante la fase de producción es cualquiera de un intervalo de velocidades (en rpm) con un límite superior de 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350 o 325 y un límite inferior seleccionado independientemente de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 o 475, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

superior.

Sin desear quedar ligado a la teoría, se piensa que cuando la concentración de oxígeno es limitada, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) o la velocidad metabólica de las células. La manipulación de la OTR se puede facilitar ajustando la velocidad de agitación, manipulando así la OUR. Se puede encontrar una descripción más detallada de la OUR y su relación con la OTR en Ochoa-García *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 27:153, 2009. Las técnicas para medir la OUR de un cultivo celular son conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, el uso de un espectrómetro de masas para monitorizar la composición de los gases de escape del cultivo celular y el cálculo de las velocidades de consumo de oxígeno y de desprendimiento de dióxido de carbono del cultivo celular.

En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento de 0,5 a 2,5 mmol/l/min por encima de la velocidad de consumo de oxígeno máxima en la célula huésped durante la fase de producción. Es un descubrimiento de la presente divulgación que la disminución de la velocidad de agitación de un cultivo celular durante la fase de producción a una velocidad suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped inferior a aproximadamente 2,5 mmol/l/min en comparación con la fase de crecimiento mejora enormemente la producción de un producto, tal como un polipéptido bicatenario de la presente divulgación.

En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento de 0,5 mmol/l/min, 1,0 mmol/l/min, 1,5 mmol/l/min, 2,0 mmol/l/min, o 2,5 mmol/l/min por encima de la velocidad máxima de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de producción. En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento de menos de aproximadamente cualquiera de las siguientes velocidades de consumo de oxígeno (en mmol/l/min) por encima de una velocidad máxima de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de producción: 2,5, 2,0, 1,5, o 1,0. En algunos casos, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento mayor que cualquiera de las siguientes velocidades de consumo de oxígeno (en mmol/l/min) por encima de una velocidad máxima de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de producción: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, o 2,5. Es decir, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de crecimiento de cualquiera de un intervalo de velocidades de consumo de oxígeno (en mmol/l/min) con un límite superior de 2,5, 2,0, 1,5 o 1,0 y un límite inferior seleccionado independientemente de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 o 2,5 por encima de una velocidad máxima de consumo de oxígeno en la célula huésped durante la fase de producción, en la que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunos casos, la velocidad máxima de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de crecimiento está en el intervalo de 3,5 mmol/l/min a 4,5 mmol/l/min. En algunos casos, la velocidad máxima de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de crecimiento es 3,5 mmol/l/min, 3,75 mmol/l/min, 4,0 mmol/l/min, 4,25 mmol/l/min, o 4,5 mmol/l/min. En algunos casos, la velocidad de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de producción está en el intervalo de 1,0 mmol/l/min a 3,0 mmol/l/min. En algunos casos, la velocidad de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de producción es 1,0 mmol/l/min, 1,25 mmol/l/min, 1,5 mmol/l/min, 1,75 mmol/l/min, 2,0 mmol/l/min, 2,25 mmol/l/min, 2,5 mmol/l/min, 2,75 mmol/l/min, o 3,0 mmol/l/min.

En algunas realizaciones, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % (rpm/rpm) más alta que la velocidad de agitación de producción. En algunas realizaciones, la célula huésped se cultiva a una velocidad de agitación del crecimiento que tiene un límite inferior de al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, o el 35 % (rpm/rpm) y un límite superior seleccionado independientemente límite de no más del 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, o el 15 % (rpm/rpm) de una velocidad de agitación de producción. En un caso preferido, una célula huésped de la presente divulgación se cultiva en un fermentador de 10 l a una contrapresión de 1 bar y una tasa de aireación de 20 l/min.

Las células huésped de la presente divulgación pueden cultivarse en diversos medios. "Medio de cultivo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición o caldo que soporte el crecimiento de las bacterias de la presente divulgación. Los medios de cultivo adecuados pueden ser líquidos o sólidos y contener cualquier nutriente, sal, tampón, elemento y otros compuestos que soporten el crecimiento y la viabilidad de las células. Los nutrientes comunes de un medio de cultivo pueden incluir fuentes de nitrógeno, carbono, aminoácidos, hidratos de carbono, oligoelementos, vitaminas y minerales. Estos nutrientes pueden añadirse como componentes individuales (como en un medio de cultivo definido) o como componentes de un extracto complejo (por ejemplo, extracto de levadura). Un medio de cultivo puede ser rico en nutrientes para soportar un crecimiento rápido o mínimo para soportar un crecimiento más lento. Un medio de cultivo también puede contener cualquier agente utilizado para inhibir el crecimiento de o destruir organismos contaminantes (por ejemplo, un antibiótico). Un medio de cultivo también puede contener cualquier compuesto usado para controlar la actividad de un promotor o enzima inducible (como un ejemplo,

se puede incluir IPTG para inducir la expresión de cualquier polinucleótido controlado por un operón lac o un promotor funcionalmente similar). Muchos ejemplos de medios de cultivo adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, medio M9, caldo de lisogenia (LB), caldo Terrific (TB), caldo NZY, medio SOB, y caldo YT.

5 Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con sales (tales cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, antimicóticos, elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), glucosa y/o una fuente de energía apropiada. Los ingredientes típicos que se encuentran en un medio de cultivo de células procariotas incluyen extracto de levadura, sales (por ejemplo, NaCl),
10 triptona, tampones (por ejemplo, tampón fosfato), glicerol, etc. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que serán conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped procariótica seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto en la técnica.

15 (i) Purificación de polipéptido biológicamente activo

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la recuperación de un polipéptido biológicamente activo de una célula huésped. Normalmente, la recuperación (los términos "purificar" o "purificación" se pueden usar indistintamente en el presente documento) de un polipéptido biológicamente activo de la presente divulgación implica
20 aislar el polipéptido de la célula huésped (o medio de cultivo celular si el polipéptido se excreta en el medio) y purificar el polipéptido de otras macromoléculas asociadas, por ejemplo, restos celulares y otros polipéptidos. En la técnica se conocen numerosas técnicas para purificar diversas proteínas de varios compartimentos de células huésped (véase, por ejemplo, Evans, Jr., TC y Xu MQ (eds.) *Heterologous Gene Expression in E. coli* (2011) *Methods in Molecular Biology* Vol 705, Humana Press). A continuación se describen técnicas a modo de ejemplo, pero estas se incluyen solo con fines ilustrativos para complementar la comprensión del experto en la técnica y de ninguna manera se
25 pretende que sean limitantes.

Cuando se usan técnicas recombinantes, se pueden producir intracelularmente proteínas bicatenarias, tales como proteínas secretoras, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si la proteína secretora se
30 produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisadas, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración.

En algunas realizaciones, la proteína secretora se recupera del periplasma de la célula huésped. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar proteínas secretoras que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando la proteína secretora se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible
35 comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de proteína secretora preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía
45 de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad entre una de las etapas de purificación normalmente preferidas. Con respecto a los anticuerpos, la idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles
50 dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar. Un experto en la técnica reconocerá que muchas de estas técnicas útiles para la recuperación de anticuerpos pueden aplicarse fácilmente para recuperar otras proteínas bicatenarias, tales como proteínas secretoras.
55

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayo y uso clínico están bien establecidas en la técnica, de acuerdo con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.
60

65

Ejemplos

La divulgación se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la divulgación. Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

Abreviaturas: Ab (anticuerpo), hAb (semianticuerpo), HC (cadena pesada), ImmTAC (receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer), IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido), LC (cadena ligera), DO (densidad óptica), ORF (marco de lectura abierto), OTR (velocidad de transferencia de oxígeno), OUR (velocidad de consumo de oxígeno), Tg (temperatura de crecimiento), Tp (temperatura de producción), TIR (región de inicio de la traducción), xIL4 (anti-interleucina-4), xIL13 (anti-interleucina-13), xIL17 (anti-interleucina-17) y xIL33 (anti-interleucina-33).

Ejemplo 1: Efecto de los niveles de chaperona y oxidoreductasa sobre el título de producción de semianticuerpos

La producción de proteínas secretadas heterólogas usando técnicas recombinantes es importante para muchas moléculas terapéuticas. Los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) son un ejemplo no limitante de proteínas secretadas heterólogas con muchos usos terapéuticos importantes, tal como la inmunoterapia en el cáncer y otras aplicaciones. La producción de anticuerpos multiespecíficos para uso terapéutico requiere la capacidad de producir los componentes básicos de estos anticuerpos, tales como semianticuerpos (hAb), a escala industrial. Para satisfacer esta demanda, en el presente documento se describen vectores de expresión optimizados y etapas de proceso que producen aumentos significativos en la producción con respecto a los métodos estándar. Es importante destacar que se encontró que un solo plásmido o un sistema plasmídico compatible para expresar conjuntamente la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) del hAb en combinación con las proteínas chaperonas FkpA, DsbA y DsbC mejora significativamente la producción del hAb ensamblado. Este sistema fue probado y se encontró que mejora la producción de múltiples hAb, demostrando su amplia utilidad para la producción de muchas proteínas secretadas. La optimización posterior de las etapas de proceso (incluyendo, por ejemplo, velocidad de agitación, pH, promotor FkpA, y temperatura de cultivo en diferentes fases de cultivo) dio como resultado aumentos aún más significativos en el rendimiento del producto.

Materiales y métodos

Construcción de vectores de semianticuerpos (hAb)

Los vectores se construyeron de manera similar a los descritos en el documento EP1356052. En particular, se prepararon diversos vectores de expresión para la expresión de los hAb. Para cada vector, se clonó un casete de expresión en el marco del plásmido pBR322 de *E. coli* en el sitio EcoRI (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90, 1978). Cada casete de expresión contenía al menos los siguientes componentes: (1) un promotor phoA para el control de la transcripción (Kikuchi *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:5671-5678, 1981); (2) una secuencia de Shine-Dalgarno de *trp* de *E. coli*, la secuencia señal de enterotoxina II termoestable (STII), o una combinación de ambas para el inicio de la traducción (Chang *et al.*, Gene 55:189-196, 1987); y (3) un terminador λ t0 para finalizar la transcripción (Scholtissek y Grosse, Nucleic Acids Res. 15:3185, 1987). Además, la secuencia señal STII o las variantes de codón silencioso de esa secuencia señal precedieron a la secuencia codificante de la cadena ligera o pesada. Esta secuencia dirige la secreción del polipéptido al periplasma (Picken *et al.*, Infect. Immun. 42:269-275, 1983; y Simmons y Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634, 1996).

Se diseñaron vectores con cistrones separados para proporcionar una expresión independiente de los genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina. En dichos vectores, la unidad cistronica para cada cadena está bajo el control de su propio promotor PhoA y va seguida de un terminador λ t0. Además, cada cistrón incorporaba la TIR (región de inicio de la traducción) para modular la expresión tanto de cadenas ligeras como pesadas (Simmons *et al.*, J. Immunol. Meth., 263:133-147, 2002). En una realización a modo de ejemplo, el casete de expresión contiene, de 5' a 3', un primer promotor PhoA seguido del cistrón para la cadena ligera (TIR-L + Cadena ligera) y el primer terminador λ t0, y un segundo promotor PhoA seguido por el cistrón para la cadena pesada (TIR-H + Cadena pesada) y el segundo terminador λ t0. Como alternativa, el casete de expresión contiene, de 5' a 3', un primer promotor PhoA seguido del cistrón para la cadena pesada (TIR-H + Cadena pesada) y el primer terminador λ t0, y un segundo promotor PhoA seguido del cistrón para la cadena ligera (TIR-L + Cadena ligera) y el segundo terminador λ t0. Tanto TIR-L como TIR-H están contenidas dentro de una secuencia señal STII o una variante de la misma.

Para los vectores de expresión de xIL13 y xIL4 IgG4 hAb, se evaluó una combinación de TIR de 1,1 y 2,2. Para los vectores de expresión de xIL17 y xIL33 IgG4 hAb se evaluó un TIR2,2. El primer número representa la fuerza de TIR de la cadena ligera y el segundo representa la fuerza de TIR de la cadena pesada. Además de los xIL13, xIL4, xIL17 y xIL33 IgG4 hAb, se construyeron y se probaron otros vectores hAb de isotipo IgG1.

Construcción de plásmidos de expresión de chaperonas

Para determinar la expresión de chaperonas a combinar con los vectores descritos anteriormente para producir los títulos más altos de los xIL13, xIL4, xIL17 y xIL33 hAb, se proporcionaron plásmidos para la expresión conjunta. Se probaron varias chaperonas conocidas, incluida la proteína FkpA, una peptidilproil cis-trans isomerasa con actividad chaperona. Para ello, se construyeron plásmidos compatibles (pACYC, Novagen, Madison, WI) que contenían el ORF para FkpA, como se describe en el documento EP1356 052 (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 9-10, en particular, el párrafo [0207]).

Ampliando este trabajo para el proceso actual, se generó de forma similar un conjunto de vectores compatibles con FkpA para modular los niveles de expresión conjunta de FkpA. La modulación de los niveles de FkpA se logró a través de la optimización del péptido señal como se ha descrito previamente (Simmons y Yansura, anteriormente, 1996). Brevemente, el extremo 5' del ORF de FkpA contenía un péptido señal FkpA (nativo o variante), o un péptido señal STII. Todas las construcciones génicas variantes de FkpA estaban bajo el control de un promotor tacII.

A continuación, estos plásmidos se cotransformaron con los plásmidos de expresión de hAb descritos anteriormente en la cepa 66F8. El genotipo de la cepa huésped 66F8 es W3110 *ΔfhuA-ΔphoA ilvG2096 (Val^r) Δprc spr43H1 ΔdegP ΔmanA lacI^Q ΔompT ΔmenE*.

Para el xIL13 hAb, se construyeron y se usaron los plásmidos TIR1,1 y TIR2,2 que codifican la LC y la HC del semianticuerpo y FkpA para transformar 66F8. En estas construcciones plasmídicas, la expresión de FkpA se controló por un promotor phoA aguas arriba del ORF para la LC. El plásmido pBR322 se mantiene normalmente a aproximadamente 30 copias/célula (Bolívar *et al.*, Gene, 2:95-113, 1977) y el plásmido pACYC se mantiene normalmente a aproximadamente 15 copias/célula (Chang y Cohen, J. Bacteriol., 134:1141-1156, 1978). Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que un aumento en el número de copias cuando FkpA se mueve sobre el plásmido de expresión de Ab puede dar como resultado un aumento en la cantidad de FkpA producida.

Construcción del plásmido de oxidorreductasa

De manera similar al sistema plasmídico compatible descrito para la expresión conjunta de FkpA, se utilizaron plásmidos compatibles para cribar diversas oxidorreductasas conocidas en combinación con el plásmido de expresión de hAb que incorporó una de las variantes TIR de FkpA descritas previamente. Este trabajo se realizó con el plásmido TIR2,2 identificado como pxIL13.2.2.FkpAc13. Además, se utilizaron plásmidos compatibles para cribar FkpA y oxidorreductasas en combinación con xIL4 y otros IgG1 hAb.

La construcción de los plásmidos compatibles con oxidorreductasas originales fue como se describe en el documento EP 1356052 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 9). El cribado de las oxidorreductasas incluyó la expresión del plásmido compatible JJ247 con el plásmido de expresión de hAb xIL13.2.2.FkpAc13. En el ejemplo de xIL13 hAb, la expresión de oxidorreductasa se indujo con IPTG 1 mM o se dejó sin inducir para modular los niveles de oxidorreductasa.

También se construyeron y se utilizaron plásmidos individuales que codifican las LC y HC del hAb y las chaperonas FkpA, DsbA y DsbC para transformar 66F8. En el ejemplo de xIL13 hAb, se construyeron dos plásmidos individuales TIR2,2 que diferían en el promotor utilizado para impulsar la expresión de FkpA. El plásmido individual MD157 contenía un promotor phoA para la expresión de FkpA y el plásmido KA01 contenía un promotor tacII. La utilización de diferentes promotores permitió una mayor modulación de la expresión de FkpA. En el ejemplo de xIL17 hAb, se construyó un plásmido individual TIR2,2 (MD341), que utilizó un promotor phoA para la expresión de FkpA. En todas las condiciones de un plásmido individual, la expresión de DsbA y DsbC estaba bajo el control de un promotor tacII en forma policistrónica. En el ejemplo de xIL4 hAb, se construyó un plásmido individual TIR2,2 que incorporó los ORF del plásmido chaperona compatible AH8145, descrito a continuación, e identificado como CB1.

Además del sistema plasmídico individual descrito anteriormente, también se evaluó un sistema plasmídico compatible con triple chaperona con varios hAb de isotipos tanto IgG1 como IgG4. En el sistema plasmídico compatible, una de las variantes TIR de FkpA descritas previamente se clonó en el plásmido policistrónico compatible con DsbA y DsbC (JJ247) y se identifica como AH8145.

Proceso de fermentación

La producción a gran escala fue esencialmente como se describe en el documento EP1356052 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4 y los párrafos [0159]-[160]). Para cada fermentación de 10 litros, se descongelaron 0,5 ml de cultivo madre congelado (que contenía DMSO al 10-15 %) y se utilizaron para inocular un matraz de agitación de 2 l que contenía 500 ml de medio de soja LB complementado con 0,5 ml de una solución de tetraciclina (5 mg/ml) y/o 2 ml de una solución de kanamicina (5 mg/ml) y 2,5 ml de una solución de fosfato de sodio 1 M. Este cultivo de siembra se desarrolló durante aproximadamente 16 horas a 30 °C con agitación y a continuación se usó para inocular el fermentador de 10 litros.

El fermentador contenía inicialmente aproximadamente 7,0 litros de medio que contenía 1,1 g de glucosa, 100 ml de sulfato de magnesio 1 M, 10 ml de una solución de elementos traza (100 ml de ácido clorhídrico, 27 g de cloruro férrico hexahidrato, 8 g de sulfato de cinc heptahidrato, 7 g de cloruro de cobalto hexahidrato, 7 g de molibdato de sodio

5 dihidrato, 8 g de sulfato cúprico pentahidrato, 2 g de ácido bórico, 5 g de sulfato de manganeso monohidrato, en un volumen final de 1 litro), 20 ml de una solución de tetraciclina (5 mg/ml en etanol) o 250 ml de una solución de ampicilina (2 mg/ml), 1 bolsa de sales de HCD, (37,5 g de sulfato de amonio, 19,5 g de fosfato de potasio dibásico, 9,75 g de fosfato de sodio monobásico dihidrato, 7,5 g de citrato de sodio dihidrato, 11,3 g de fosfato de potasio monobásico), 200 g de soja BL4 (un hidrolizado de proteína de soja) y 100 gramos de extracto de levadura. Las fermentaciones se realizaron inicialmente a 30 °C con 20 litros estándar por minuto (slpm) de flujo de aire y se controlaron a un pH de 7,0 ± 0,2 (aunque en algunos casos ocurrieron desviaciones ocasionales más allá de este intervalo). La contrapresión del fermentador se mantuvo a 1 bar manométrico y la velocidad de agitación se fijó inicialmente en 650 rpm. Como se analiza en detalle en el Ejemplo 2 a continuación, la velocidad de agitación también se puede variar para manipular la velocidad de transferencia de oxígeno en el fermentador y, en consecuencia, controlar la velocidad de respiración celular. Además, como se analiza en detalle en el Ejemplo 3 a continuación, la temperatura durante las fases de crecimiento y producción se puede ajustar para maximizar el rendimiento del producto.

15 Después de la inoculación del fermentador con el medio que contenía células del matraz de agitación, el cultivo se desarrolló en el fermentador hasta densidades celulares elevadas utilizando un algoritmo informático para suministrar una solución de glucosa concentrada al fermentador. También se suministraron al fermentador hidróxido de amonio (solución al 58 %) y ácido sulfúrico (solución al 24 %) según fue necesario para controlar el pH. También se añadió antiespumante L-61 en algunos casos para controlar la formación de espuma.

20 Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular de aproximadamente 40 de DO₅₅₀, se añadieron al fermentador 100 ml más de sulfato de magnesio 1 M. Además, se añadió un pienso de sal concentrado (12,5 g de sulfato de amonio, 32,5 g de fosfato de potasio dibásico, 16,25 g de fosfato de sodio monobásico dihidrato, 2,5 g de citrato de sodio dihidrato, 18,75 g de fosfato de potasio monobásico, 10 ml de cloruro férrico al 2,7 % y 10 ml de elementos traza en un volumen final de 1250 ml) al fermentador y se inició a una velocidad de 2,5 ml/min cuando el cultivo alcanzó aproximadamente 20 de DO₅₅₀ y continuó hasta que se añadieron aproximadamente 1250 ml a la fermentación. Las fermentaciones se continuaron normalmente durante 70-80 horas.

30 **Preparación de muestras para electroforesis, inmunotransferencia y análisis de HPLC**

La preparación de muestras solubles no reducidas es similar a lo que se describe en el documento EP1356052 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4, en particular, el párrafo [0162]). En particular, se prepararon muestras solubles no reducidas de la siguiente manera: Se descongelaron a temperatura ambiente muestras de caldo completo de 1 ml congeladas tomadas durante el curso de la fermentación. Se añadieron 100 µl del caldo completo descongelado a 500 µl de tampón de extracción. (Tampón de extracción: Tris 10 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, 0,2 mg/ml recién añadidos de lisozima de huevo de gallina, y ácido yodoacético recién preparado hasta una concentración final de 5-10 mM). Las muestras de caldo completo más el tampón de extracción se incubaron en hielo durante 5-10 minutos, a continuación se sometieron a 2 x 10 pulsos, después se centrifugaron a 4 °C y 14.000 rpm durante 15-20 minutos. El sobrenadante se eliminó como fracción soluble. Para el análisis por SDS-PAGE e inmunotransferencias, la fracción soluble se diluyó 1:10 en tampón de muestra 2X Novex Tricine sin agente reductor. Se cargaron 10 µl de esta preparación en un gel Novex Bis-Tris al 10 % NuPage de 10 pocillos y se sometió a electroforesis a 150 V con tampón MES. A continuación, el gel se utilizó para una inmunotransferencia o se tiñó con azul de Coomassie.

45 Se enviaron muestras de las fracciones solubles para análisis mediante un ensayo LC-Kappa/RP. Este ensayo es un ensayo de HPLC bidimensional en el que la primera columna es una columna de afinidad que captura componentes de IgG que contienen una cadena ligera kappa y la segunda columna es una columna de fase inversa. Se configuró una estación de trabajo de HPLC integral en el modo de columna dual. Los depósitos de disolvente fueron: Disolvente 1A, tampón de carga por afinidad; Disolvente 1B, tampón de elución por afinidad, TFA al 0,2 % en agua; Disolvente 2A, tampón acuoso de fase inversa, TFA al 0,1 % en agua; Disolvente 2B, tampón de elución orgánico de fase inversa, TFA al 0,1 % en acetonitrilo al 80 %. La primera columna fue la columna de afinidad POROS® CaptureSelect™ LC Kappa (2,1 x 30 mm) adquirida en Life Technologies (Carlsbad, CA). Todos los procedimientos que involucraban la columna de afinidad se realizaron a temperatura ambiente.

55 La segunda columna era una columna de fase inversa POROS® R2 de 20 µm (2,1 x 30 mm) adquirida en Life Technologies (Carlsbad, CA). La temperatura de la columna de fase inversa se mantuvo a 80 °C.

60 La columna de afinidad se equilibró en tampón de carga y se cargó una muestra a un caudal de 2 ml/min. El flujo pasante se dirigió a desecharse. Después de cargar la muestra, la columna de afinidad se lavó con tampón de carga (3 ml) para reducir los componentes unidos no específicamente. A continuación, mediante el cambio de válvula, la columna de afinidad se conectó a la columna de fase inversa y se eluyó con tampón de elución (5 ml) a un caudal de 2 ml/min para transferir los componentes capturados por afinidad a la columna de fase inversa. Durante esta etapa de transferencia, el detector UV integral se ubicó después de la columna de afinidad y antes de la columna de fase inversa, por lo que se monitorizó la elución de la columna de afinidad, que se convirtió en la carga de la columna de fase inversa. Después de la elución y la desconexión de la columna de fase inversa, la columna de afinidad se lavó con agua (2 ml) y posteriormente se reequilibró con tampón de carga (4 ml).

La columna de fase inversa cargada se lavó con TFA acuoso al 0,1 % (1,1 ml). El caudal se ajustó a 2 ml/min y se realizó un gradiente rápido (0,25 min) con respecto al disolvente 2B al 35 % (TFA al 0,1 %/acetonitrilo al 80 %) seguido de un gradiente poco profundo con respecto al disolvente 2B al 50 % durante 3 min. La elución se completó mediante un gradiente con respecto al disolvente 2B al 100 % en 0,5 min y se mantuvo durante 1,5 min. A continuación, la columna de fase inversa se devolvió a las condiciones iniciales en 0,05 min y se mantuvo durante 2 min para volver a equilibrarse. El eluato de la columna se monitorizó a 280 y 214 nm. La cuantificación se realizó comparando las áreas pico integradas con las de los estándares de concentraciones conocidas basadas en la separación de la columna de fase inversa.

También se cuantificaron las cantidades solubles y totales de LC y HC producidas durante el proceso de fermentación. Para realizar la cuantificación total de RP-HPLC, las muestras de caldo de fermentación se diluyeron 10 veces con DL-Ditiotreitol 100 mM (Sigma cat. N.º 43816) en Guanidina HCl 6 M, Tris 360 mM, EDTA 2 mM a pH 8,6) con 200 mM. Las muestras se agitaron vorticialmente, se incubaron a 60 °C durante 20 min y se centrifugaron a 13.000 RPM durante 15 min a 4 °C. La fracción soluble se filtró usando un filtro de 0,22 um antes de la inyección en el HPLC. El sistema HPLC utilizado fue un sistema Agilent Technologies 1290 Infinity. Las muestras se inyectaron en una columna analítica de resolución rápida Zorbax 300SB-C3 (4,6 x 150 mm 3,5 micrómetros) (cat. N.º 863973-909). La fase móvil A consistió en ácido trifluoroacético al 0,1 % (Thermo cat. N.º 28901) en SQH2O y la fase móvil B ácido trifluoroacético al 0,08 % en acetonitrilo de calidad HPLC (Honeywell cat. N.º AH015-4).

Para realizar la cuantificación total por RP-HPLC soluble, las muestras de caldo de fermentación se homogeneizaron (10.000 RPM) y se sometieron a ultrasonidos (amplitud al 88 %) durante 10 s cuatro veces con un Pro-Scientific DPS-20. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4 °C y 14.000 rpm durante 15-20 minutos. El sobrenadante se eliminó como fracción soluble y se desnaturizó y se procesó en RP-HPLC como se ha descrito anteriormente.

25 **Resultados**

Efecto de la expresión de FkpA sobre el título de hAb

Como se muestra en la **figura 1A**, la producción de subunidades de cadena ligera y pesada a partir del vector xIL13 hAb TIR1,1 dio como resultado cantidades totales de producción de cadenas ligeras y pesadas de 2,9 g/l y 1,2 g/l, respectivamente. Para TIR2,2, la cantidad total de cadenas ligeras y pesadas producidas fue de 6,4 g/l y 4,1 g/l, respectivamente.

Sin embargo, la cantidad de producción total de subunidades no dio como resultado una acumulación significativa de subunidades solubles. Usando el plásmido xIL13 TIR1,1 hAb, la cantidad soluble total de cadenas ligeras y pesadas producidas fue de 0,2 g/l y menos de 0,1 g/l, respectivamente (**figura 1B**). Para el TIR2,2 hAb, las cantidades solubles totales de cadenas ligeras y pesadas producidas fueron de 0,3 g/l y 0,3 g/l, respectivamente (**figura 1C**). El título de xIL13 hAb ensamblado producido para la fermentación de TIR1,1 fue sólo de 0,1 g/l, y para la fermentación de TIR2,2 el título fue inferior a 0,2 g/l (**figura 2**). Estos resultados sugieren la presencia de ineficiencias significativas en el plegamiento y/o el ensamblaje del producto de hAb. Por lo tanto, se realizó un trabajo adicional para evaluar el efecto sobre el título del uso de los plásmidos TIR1,1 y TIR2,2 con la expresión conjunta de chaperonas.

Se sabe que varias clases de proteínas chaperonas promueven el plegamiento y el ensamblaje de proteínas (**figura 3A-B**). Las chaperonas particulares de interés incluyen FkpA, que se sabe que funciona como una peptidil-prolil cis-trans isomerasa y una chaperona, y DsbA y DsbC, que se sabe que funcionan como oxidorreductasas. Se realizaron experimentos para probar si la expresión de FkpA, DsbA y DsbC afectaba a la producción de hAb.

En particular, se examinó el efecto de expresar FkpA usando un plásmido separado (sistema plasmídico compatible) o el mismo plásmido (sistema plasmídico individual) que codificaba los ORF de HC y LC de hAb (**figura 4A-B**). El uso de un solo plásmido de expresión elimina la necesidad de usar múltiples antibióticos u otros medios de presión selectiva para asegurar la retención plasmídica. En el sistema plasmídico individual utilizado para xIL13 hAb, el promotor que impulsa la expresión de FkpA se cambió de un promotor tacII inducible por IPTG a un promotor phoA. Por lo tanto, la depleción de fosfato en el cultivo conduce a la expresión de HC, LC y FkpA.

Niveles aumentados de expresión conjunta de chaperona de FkpA se correlacionaron con cantidades aumentadas de acumulación de cadena pesada monomérica soluble además de un aumento de hAb ensamblado para un hAb de isotipo IgG1 (xVEGF) (**figura 5A**). En este experimento, un conjunto de variantes de expresión de FkpA, como se ha descrito anteriormente, se cribó con inducción de IPTG 1 mM. Sin la expresión conjunta de FkpA, el título del xVEGF hAb fue de 0,2 g/l y en la condición con el nivel más alto de expresión conjunta de FkpA (FkpA(wt)), el título de hAb fue de aproximadamente 0,4 g/l (**figura 5B**).

Para la producción de xIL13 hAb, se probó un sistema plasmídico compatible (expresión de xIL13 HC y LC de un plásmido y FkpA de otro, como se muestra en la **figura 4A**) usando un vector de expresión de anticuerpo TIR1,1 o TIR2,2. Para los sistemas plasmídicos compatibles inducidos con IPTG 1 mM para impulsar la expresión conjunta de FkpA, el título para el plásmido TIR1,1 fue de 0,2 g/l y 0,4 g/l para el plásmido TIR2,2 (**figura 6A**, carriles 3 y 4). Esto dio como resultado un aumento aproximado de dos veces en el título en comparación con las condiciones TIR1,1 y

TIR2,2 con niveles endógenos de FkpA (**figura 6A**, carriles 1 y 2). La **figura 6B** muestra la cantidad de expresión de FkpA inducida en el sistema compatible, en comparación con la expresión endógena, según se midió por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) en unidades de miliabsorción (mAu) y transferencia de Western.

- 5 También se probó el sistema plasmídico individual para la expresión de FkpA y la producción de hAb mostrado en la **figura 4B**. Para el xIL13 hAb, los títulos para el plásmido individual TIR1,1 y TIR2,2 fueron 0,4 g/l y 0,7 g/l, respectivamente (**figura 6A**). Esto representó un aumento de aproximadamente dos veces en el título sobre el sistema plasmídico compatible. El nivel de expresión de FkpA en el sistema plasmídico individual también fue aproximadamente dos veces mayor que en el sistema plasmídico compatible inducido (**figura 6B**). Los niveles
10 aumentados de expresión de FkpA se correlacionaron con cantidades aumentadas de acumulación de cadena pesada monomérica soluble en ambas condiciones TIR.

- Se probó un tercer hAb (xIL4 IgG4) con las condiciones TIR1,1 y TIR2,2 con expresión conjunta de FkpA inducida a partir de un sistema plasmídico compatible. En este experimento, la expresión conjunta de FkpA(wt) aumentó la
15 cantidad de cadena pesada monomérica soluble en ambas condiciones TIR (**figura 7A**), pero no dio como resultado un aumento en el título de hAb producido (**figura 7B**).

- Se probó un cuarto hAb (xVEGFC IgG1) con la expresión conjunta de FkpA inducida a partir de un sistema plasmídico compatible. En este experimento, la expresión conjunta de FkpA(wt) aumentó la cantidad de cadena pesada
20 monomérica soluble y aumentó el título de 0,5 g/l a 0,8 g/l (**figura 8A**). La expresión aumentada de FkpA determinada por la tinción de Coomassie (**figura 8B**) se correlacionó con un aumento en la acumulación de cadena HC monomérica soluble (**figura 8C**). En resumen, estos resultados sugieren que la expresión de FkpA mejora la acumulación de cadena pesada monomérica soluble, pero que el efecto sobre el título de hAb ensamblado es variable. Esto indica que es deseable una mayor optimización.

- 25 *Efecto de la expresión de DsbA y DsbC sobre el título de hAb*

- La producción de xIL13 hAb se optimizó adicionalmente combinando el pxIL13.2.2.FkpAc13 (plásmido individual) descrito anteriormente con un plásmido compatible para la expresión de las oxidoreductasas DsbA y DsbC (**figura**
30 **9**). Un plásmido que expresa tanto DsbA como DsbC (JJ247) con pxIL13.2.2.FkpAc13 aumentó los títulos de hAb. La **figura 10** muestra el título del xIL13 hAb producido en el tiempo, en presencia y ausencia de inducción por IPTG de DsbA y DsbC. El título más alto para pxIL13.2.2.FkpAc13 con JJ247 se alcanzó a las 52 horas de fermentación. En este punto temporal, en la condición sin IPTG (condición no inducida), el título de xIL13 fue de $1,2 \pm 0,2$ g/l, y en la condición con IPTG (condición inducida), el título de xIL13 fue de $1,0 \pm 0,2$ g/l (**figura 10**). La caída en el título de 52
35 a 72 horas para ambas condiciones probadas fue significativa y se atribuyó a una caída en la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y al aumento de la osmolalidad durante el proceso de fermentación como se describe en el Ejemplo 2.

- También se evaluó un sistema compatible para expresar DsbA, DsbC y FkpA (AH8145) con los plásmidos de expresión de Ab xIL4 TIR1,1 y TIR2,2 (**figura 11A**). La expresión conjunta no inducida de las tres chaperonas dio como resultado un título de TIR1,1 y TIR2,2 de 0,8 g/l y 1,2 g/l, respectivamente (**figura 12**, carriles 5 y 6). Esto representó un aumento de aproximadamente seis veces en el título para la condición TIR2,2 en comparación con la condición TIR2,2 compatible con FkpA previamente descrita (**figura 12**, carriles 3 y 4).

- 45 El sistema plasmídico AH8145 no inducido compatible se evaluó adicionalmente con otro hAb. Usando un vector basado en TIR2,2 para producir el xVEGFC IgG1 hAb, la condición AH8145 compatible no inducida aumentó el título a 1,0 g/l desde 0,8 g/l, en comparación con la expresión conjunta de FkpA solamente (**figura 13**). Se probó un quinto hAb (xVEGFA IgG1) con las condiciones tanto TIR1,1 como TIR2,2 con el plásmido compatible con AH8145. Sin la expresión conjunta de chaperona, los títulos para las condiciones tanto TIR1,1 como TIR2,2 fueron similares, aproximadamente 0,9 g/l (**figura 14** carriles 1 y 3). Con el plásmido compatible en la condición AH8145 no inducida, el título para los plásmidos TIR1,1 y TIR2,2 fue 1,2 g/l y 1,7 g/l, respectivamente (**figura 14** carriles 2 y 4).

- Se generó la creación de un plásmido individual xIL4 TIR2,2 que incorporó los ORF de chaperona de AH8145 (CB1) y se ilustra en la **figura 11B**. El plásmido CB1 sin la adición de IPTG produjo títulos ligeramente más altos que los observados con el sistema plasmídico compatible (**figura 15**). Cabe señalar que los títulos de hAb informados en esta comparación se generaron a partir de fermentaciones que utilizaron una estrategia de agitación optimizada como se describe en el Ejemplo 2. Por transferencia de Western, los niveles de las tres chaperonas fueron ligeramente más altos con CB1 (**figura 15**). Sin desear quedar ligado a la teoría, el sistema plasmídico individual puede permitir un mayor número de copias de plásmido, lo que puede dar como resultado rendimientos más altos.

- 60 El sistema plasmídico individual de xIL13 MD157 se comparó con el sistema plasmídico compatible no inducido pxIL13.2.2.FkpAc13 y compatible con JJ247 (**figura 16**). La condición del plásmido individual MD157 produjo títulos de $2,1 \pm 0,3$ g/l en comparación con $1,9 \pm 0,04$ g/l en el sistema compatible (**figura 17**). Cabe señalar que los títulos informados en esta comparación se generaron a partir de fermentaciones que utilizaron una estrategia de agitación optimizada como se describe en el Ejemplo 2.
65

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la expresión conjunta de FkpA junto con DsbA y DsbC aumenta la producción de hAb ensamblado, utilizando múltiples construcciones de hAb para confirmar estos efectos.

Ejemplo 2: Efecto del consumo de oxígeno sobre la producción de semianticuerpos

Los resultados anteriores demuestran una mejora en la producción de hAb lograda por la expresión conjunta de FkpA, DsbA y DsbC junto con hAb HC y LC. Sin embargo, incluso con esta producción mejorada, se encontró que los títulos se estabilizaban o incluso disminuían en puntos de tiempo después de 52 horas de producción. Por lo tanto, se realizaron experimentos adicionales para optimizar aún más la producción de hAb.

Como se ha descrito previamente, las fermentaciones se realizaron inicialmente a 30 °C con 20 litros estándar por minuto (slpm) de flujo de aire y se controlaron a un pH de $7,0 \pm 0,2$. La contrapresión del fermentador se mantuvo a 1 bar manométrico y la velocidad de agitación se fijó inicialmente en 650 rpm. El manómetro adicional de contrapresión dio como resultado una concentración inicial de oxígeno disuelto (dO_2) del 200 %. La solución de glucosa concentrada se suministró después de que la señal de dO_2 cayera por debajo del 2 % del nivel de partida, normalmente aproximadamente dos horas hasta el cultivo de producción, y se suministró continuamente durante el transcurso de la fermentación de manera que la glucosa era un nutriente no limitante.

A las 12 horas, la densidad celular en el cultivo fue suficiente para mantener la concentración de dO_2 en o cerca del cero por ciento. Sin desear quedar ligado a la teoría, se piensa que cuando la concentración de oxígeno es limitada, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) o la velocidad metabólica de las células. La manipulación de la OTR se facilitó ajustando la velocidad de agitación y tuvo un efecto directo en la OUR de cultivo. Se usó un espectrómetro de masas para monitorizar la composición de los gases de escape de las fermentaciones y se permitió el cálculo del consumo de oxígeno y las velocidades de desprendimiento de dióxido de carbono en las fermentaciones.

Como se muestra en la **figura 18**, en el pxIL13.2.2.FkpAc13 con el sistema plasmídico JJ247 descrito anteriormente, tanto los cultivos TIR2,2 inducidos como no inducidos tenían una OUR máxima de 4,25 mmol//min a las 12 horas, después de lo cual el dO_2 se volvió limitado. Estos cultivos se desarrollaron en agitación a una velocidad constante de 650 rpm. La **figura 19** muestra la osmolalidad de estos cultivos en el tiempo. En conjunto, las **figuras 18-19** muestran que, después de 50 horas, la OUR del cultivo celular disminuyó drásticamente y la osmolalidad aumentó.

La **figura 20** muestra el título de xL13 hAb producido en el tiempo en estos cultivos. Se observó una caída en el título de $1,2 \text{ g/l} \pm 0,2 \text{ g/l}$ a las 52 horas a $0,7 \pm 0,04 \text{ g/l}$ a las 72 horas. De manera similar, en la condición inducida, se observó una caída de $1,0 \pm 0,2 \text{ g/l}$ a las 52 horas a $0,5 \pm 0,05 \text{ g/l}$ a las 72 horas. Curiosamente, esta caída en la producción ocurrió al mismo tiempo que la caída de la OUR y la osmolalidad aumentó en estos cultivos.

Para mitigar la caída en el título y eliminar el aumento en la osmolalidad, se evaluó un cambio de agitación a las 26 horas con la condición TIR2,2 no inducida. La velocidad de agitación se cambió de 650 rpm a un nivel que alcanzó un punto de ajuste de la OUR objetivo. Se probaron cuatro puntos de ajuste de la OUR diferentes: aproximadamente 1,5, 1,75, 2,0 y 2,5 mmol//min. Los cambios de agitación con los puntos de ajuste de la OUR entre aproximadamente 1,5 y 2,0 mmol//min eliminaron la caída en la OUR (**figura 21**) y el aumento de la osmolalidad (**figura 22**).

Es importante destacar que en todas las condiciones de cambio de agitación, el título fue más alto que en la condición sin cambio a las 54 horas (**figura 23**). En la condición aproximada de 2,5 mmol//min, la OUR descendió en ~60 horas (**figura 21**) y la osmolalidad se elevó a un pico de 1200 mOsm a las 72 horas (**figura 22**). En 72 horas, el título de la condición aproximada de 2,5 mmol//min ($0,7 \text{ g/l}$) descendió a niveles similares a los de la condición sin cambio ($0,6 \pm 0,1 \text{ g/l}$). El título promedio para la condición aproximada de 2,0 mmol//min fue el más alto ($2,4 \pm 0,6 \text{ g/l}$) de las cuatro condiciones probadas; sin embargo, hubo cierta variabilidad en los títulos y pareció haber una ligera disminución en el perfil de la OUR. La condición aproximada de 1,5 mmol//min había reproducido títulos promedio de $2,1 \pm 0,3 \text{ g/l}$, pero de nuevo parecía haber cierta variabilidad en el perfil de la OUR al final de la fermentación. La condición aproximada de 1,75 mmol//min tenía ambos títulos reproducibles ($1,8 \pm 0,2 \text{ g/l}$), así como tendencias de la OUR consistentes, por lo que se eligió como el punto de ajuste preferido.

Estos resultados demuestran que el cambio de la velocidad de agitación de los cultivos mitiga la disminución observada en la OUR y el aumento de la osmolalidad. Es importante destacar que estos cambios de agitación también permiten un título de producción de hAb mejorado, particularmente en puntos de tiempo de producción posteriores.

Ejemplo 3: Efecto de la temperatura sobre la producción de semianticuerpos

Si bien los Ejemplos anteriores demuestran ganancias significativas en la producción de hAb, se realizaron pruebas adicionales para optimizar aún más el proceso de producción. Por lo tanto, para la producción de xL13 hAb, se utilizaron como puntos de partida el sistema plasmídico individual de alto rendimiento descrito en el Ejemplo 1 y el punto de ajuste de la OUR de aproximadamente 1,75 mmol//min descrito en el Ejemplo 2. El proceso se optimizó aún más para producir rendimientos de producción significativamente mayores, como se describe a continuación.

El proceso de fermentación de una realización preferida de la presente divulgación puede dividirse en dos segmentos diferentes: la fase de crecimiento y la fase de producción. En la fase de crecimiento, la mayoría de los nutrientes están en exceso, y la densidad del cultivo aumenta rápidamente. En la fase de producción, el fosfato se limita, el crecimiento se detiene, y comienza la expresión del producto de interés. Se probó el efecto de la temperatura sobre la producción de hAb para cada una de estas fases.

En combinación con los experimentos de temperatura, se evaluó un segundo huésped. En estos experimentos, el plásmido MD157 se transformó en el huésped de producción 67A6. El genotipo de la cepa 67A6 es W3110 Δ fhuA Δ phoA *ilvG+* Δ prc *spr43H1* Δ degP Δ manA *lacIQ* Δ ompT Δ menE742 *degPS210A*.

La cepa 67A6 contiene una introducción de un alelo deficiente en proteasa del gen *degP* (también conocido como *htrA* y *pta*), que codifica DegP. DegP (también conocida como Proteasa Do) es una serina proteasa periplásmica necesaria para la supervivencia a altas temperaturas. Además, DegP actúa como una chaperona molecular. La sustitución de una alanina por serina elimina la actividad proteolítica de DegP pero no afecta a su función de chaperona (Spiess *et al.*, Cell, 97:339-347, 1999).

Se realizó una optimización de la temperatura tanto para la fase de crecimiento (Tg) como para la fase de producción (Tp) para el sistema plasmídico individual xIL13 TIR2,2. La **figura 24** muestra el crecimiento de cultivos desarrollados con una Tg/Tp constante de 30 °C o 28 °C. Una Tg/Tp constante de 28 °C dio como resultado un retraso en la velocidad de crecimiento en comparación con la Tg/Tp constante de 30 °C. La **figura 25** muestra la OUR de cultivos desarrollados a estas temperaturas. De forma similar a la velocidad de crecimiento, la OUR se retrasa cuando los cultivos se desarrollan a una Tg/Tp constante de 28 °C, en comparación con 30 °C.

Como se muestra en la **figura 26**, el fosfato se agotó a las 22 ± 2 horas usando una Tg/Tp constante de 30 °C. Cuando la Tg/Tp se redujo a 28 °C, la velocidad de crecimiento del cultivo se retrasó como se ha descrito anteriormente, y el agotamiento de fosfato se cambió a 26 ± 2 horas.

La **figura 27** muestra la producción de xIL13 hAb de estos cultivos. Para cada condición, la expresión del producto comenzó en el momento en que se produjo el agotamiento del fosfato. La condición de Tg/Tp constante a 28 °C logró un título final de $2,5 \pm 0,2$ g/l, en comparación con $1,3 \pm 0,2$ g/l para la condición de Tg/Tp constante a 30 °C.

En un esfuerzo por aumentar la cantidad de tiempo en la fase de producción, se probó una estrategia de cambio de temperatura. En este experimento, la temperatura de la fase de crecimiento se fijó en 30 °C y a las 20 horas la temperatura se cambió a 28 °C. Los perfiles de crecimiento (**figura 28**), fosfato (**figura 29**), y OUR (**figura 30**) entre 0 y 20 horas fueron similares para las condiciones de cambio de Tg30/Tp28 °C y Tg/Tp 30 °C constante.

Como se muestra en la **figura 31**, el uso de un cambio de temperatura a 28 °C en el momento de la inducción del producto proporcionó un aumento adicional de 0,6 g/l en el título, comparando un título final de 3,1 g/l producido bajo las condiciones de Tg30/Tp28 °C con un título final de 2,5 g/l producido bajo la condición de Tg/Tp 28 °C constante. Estos resultados demuestran que desarrollar el cultivo a una temperatura más alta, y a continuación disminuir la temperatura de cultivo en el momento de la producción puede dar como resultado un aumento significativo en la formación del producto.

Se realizó un diseño del experimento (DoE) factorial parcial para determinar las condiciones operativas óptimas para el xIL13 hAb utilizando la cepa huésped 67A6. El DoE se centró en tres parámetros operativos y el nivel de FkpA.

Tabla 3-1. Parámetros de xIL13 hAb

Patrón	Temp. de crecimiento (Tg)	Temp. de producción (Tp)	pH	Promotor FkpA	Título (g/l)
-+ -+	30	28	6,7	phoA	2,8
0001	32	26,5	6,85	phoA	1,9
----	30	25	6,7	tac	1,4
+ - + -	34	25	7	tac	2,9
+ _ +	34	25	6,7	phoA	4,6
-- ++	30	25	7	phoA	1,8
- ++ -	30	28	7	tac	1,6
++++	34	28	7	phoA	2,8
++ --	34	28	6,7	tac	1,6
0002	32	26,5	6,85	phoA	3,3

Como se muestra en la Tabla 3-1, los parámetros operativos incluían Tg y Tp, así como pH. El patrón se refiere al intervalo operativo de un parámetro específico; (-) se refiere a un parámetro de valor bajo, (+) se refiere a un parámetro de valor alto, y 0001 y 0002 se refieren a un parámetro de punto central. La Tg varió de 30 a 34 °C, la Tp varió de 25

a 28 °C, y el pH varió entre 6,7 y 7,0. La cantidad de FkpA producida se moduló por el promotor utilizado. Se generaron niveles altos de FkpA a partir del promotor phoA en MD157 y se generaron niveles bajos de FkpA a partir del promotor tac no inducido en KA01. El análisis factorial parcial se realizó mediante la ejecución de 10 experimentos.

5 Como se muestra en la **figura 32**, estos factores tuvieron efectos significativos sobre el título de xIL13 hAb producido. El título de hAb producido por las condiciones utilizadas para los experimentos DoE descritos en la Tabla 3-1 varió de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 g/l.

10 El plásmido individual xIL4 (CB1) se probó con las condiciones óptimas de fermentación identificadas a partir del DoE de xIL13 (Tg 34 °C, Tp 28 °C, pH 7,0). Sin embargo, en la condición CB1, se usó un promotor tacII sin inducción de IPTG para impulsar la expresión de FkpA. El título de xIL14 hAb se comparó con una condición de fermentación en la que la Tg/Tp se mantuvo constante a 30 °C y el pH se mantuvo a 7,0. El título de xIL4 hAb aumentó de 1,3 g/l a 3,1 g/l con las nuevas condiciones del proceso sin la adición de IPTG (**figura 33**).

15 Se realizó un DoE factorial parcial para determinar las condiciones operativas óptimas para el xIL17 hAb. El plásmido individual MD341 se construyó reemplazando los ORF para las LC y HC del plásmido individual xIL13 hAb (MD157) por el ORF de las LC y HC de xIL17. Los promotores usados para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y chaperonas eran idénticos al plásmido xIL13 (MD157). El DoE se centró en tres parámetros operativos.

20

Tabla 3-2. Parámetros de xIL17 hAb

Patrón	Temp. de crecimiento (Tg)	Temp. de producción (Tp)	pH	Título (g/l)
-+-	30	30	6,7	0,38
0001	32	27,5	7,0	2,0
---	30	25	6,7	2,5
--+	30	25	7,3	2,6
++	34	25	7,3	2,6
0002	32	27,5	7,0	1,9
++-	34	30	6,7	0,34
+--	34	25	6,7	2,0
-++	30	30	7,3	0,2
+++	34	30	7,3	0,12

Como se muestra en la Tabla 3-2, los parámetros operativos incluían la Tg y la Tp, así como el pH. La Tg varió de 30 a 34 °C, la Tp varió de 25 a 30 °C, y el pH varió entre 6,7 y 7,3. La **figura 34** muestra que la acumulación de títulos más significativa se logró en condiciones con una Tp de 25 °C

25

La **figura 35** muestra los efectos de optimizar primero la expresión conjunta de la proteína chaperona y a continuación optimizar las etapas de proceso (por ejemplo, velocidad de agitación, Tg, y Tp) en la producción del título de xIL13 hAb. En una realización a modo de ejemplo, la optimización molecular (por ejemplo, la expresión de proteínas chaperonas y las características del vector) proporcionó un aumento de aproximadamente 16 veces en el título. Este nivel de producción se mejoró aún más en aproximadamente 3,5 veces a través del desarrollo del proceso (por ejemplo, velocidad de agitación, Tg, y Tp). En conjunto, estos resultados demuestran que se pueden conseguir ganancias significativas en la producción y la robustez mediante la optimización de variables incluyendo expresión de chaperonas, sistemas de vectores, velocidad de agitación, pH, y temperaturas de crecimiento/producción. Finalmente, se determinó que las condiciones con una Tg a 34 °C, Tp a 25 °C, un pH de 6,7 y el nivel de FkpA producido por el promotor phoA dieron como resultado el título más alto de xIL13 hAb.

30

35

Ejemplo 4: Efecto de la cepa huésped sobre la producción de semianticuerpos

Si bien los Ejemplos anteriores demuestran ganancias significativas en la producción de hAb, se realizaron pruebas adicionales para caracterizar las diferencias potenciales en la producción de hAb entre las cepas huésped 66F8 y 67A6. Por lo tanto, para la producción de hAb, el sistema plasmídico individual de alto rendimiento descrito en el Ejemplo 1, el cambio de la OUR descrito en el Ejemplo 2, y el cambio de temperatura descrito en el Ejemplo 3 se evaluaron en las dos cepas huésped de *E. coli*: 66F8 y 67A6. El genotipo de la cepa 66F8 es W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG+ \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacIQ \Delta ompT \Delta menE742$. El genotipo de la cepa 67A6 es W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG+ \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacIQ \Delta ompT \Delta menE742 degPS210A$.

40

45

El xIL13 hAb se expresó en las cepas huésped 66F8 y 67A6. Las fermentaciones se realizaron en condiciones que emplean cambios de temperatura y de la velocidad de agitación como se ha descrito anteriormente. El uso de la cepa 67A6 dio como resultado un aumento en el título de xIL13 hAb soluble (**figura 36A**) y en la acumulación total de subunidades tanto de LC como de HC en comparación con la cepa 66F8 (**figura 36B**).

50

El xIL4 hAb también se expresó en las cepas huésped 66F8 y 67A6. Cuando se realizaron las fermentaciones de xIL4 hAb a una temperatura constante de 30 °C, se obtuvieron títulos similares de aproximadamente 1,5 g/l de ambas cepas (**figura 37A**). Sin embargo, en condiciones de fermentación en las que la Tg se redujo de 34 °C a una Tp de 25 °C, la cepa 67A6 produjo un promedio de 3,0 g/l y la cepa 66F8 produjo un promedio de 2,0 g/l (**figura 37B**). Además, la acumulación total de subunidades tanto de LC como de HC en las fermentaciones de 67A6 fue mayor que en las fermentaciones de 66F8 en condiciones que emplean un cambio de temperatura (**figura 38A** y **figura 38B**).

Por lo tanto, tanto xIL13 hAb como xIL4 hAb son dos ejemplos de un título beneficioso proporcionado por la cepa huésped 67A6 y una temperatura de producción reducida en relación con la temperatura de crecimiento. Sin quedar ligado a la teoría, la acumulación de proteína recombinante pareció estabilizarse en las cepas huésped desprovistas de DegP, mientras que en la cepa huésped con el mutante DegPS210A, la proteína recombinante pareció acumularse hasta que terminó la fermentación.

Ejemplo 5: Producción de xIL33 hAb utilizando un vector de expresión optimizado y condiciones de cultivo optimizadas

El xIL33 hAb (plásmido MD501) se construyó reemplazando los ORF para las LC y HC del plásmido individual xIL13 hAb (MD157) por el ORF de las LC y HC de xIL33. Los promotores usados para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y chaperonas eran idénticos al plásmido xIL13 (MD157) (**figura 39**). Se realizó una única fermentación con un vector de expresión de xIL33 hAb que contenía solo los ORF para la LC y HC de xIL33 (MD481). El plásmido MD481 no contenía ORF para las chaperonas moleculares DsbA, DsbC o FkpA. La fermentación se realizó a una temperatura constante de 30 °C, un pH de 7,0, y una velocidad de agitación de 650 RPM (caso base de la **figura 40**). A continuación, se realizó una única fermentación con un vector de expresión de xIL33 hAb que contenía ORF para la LC y HC de xIL33, así como ORF para las chaperonas moleculares DsbA, DsbC o FkpA (MD501). Se utilizaron las mismas condiciones operativas para la fermentación de MD501 que para la fermentación de MD481. El uso del plásmido individual (MD501) dio como resultado un aumento aproximado de 10 veces en el título de xIL-33 hAb en comparación con el caso base.

Se realizó un DoE factorial parcial para determinar las condiciones de cultivo óptimas para el plásmido individual MD501 de xIL33 hAb. El DoE se centró en cuatro parámetros en un factorial fraccional con 10 experimentos que incluían dos réplicas de puntos centrales en el huésped 67A6 (Tabla 5-1). Los cambios de velocidad de agitación y temperatura se realizaron a una DO₅₅₀ de 150.

Tabla 5-1. Parámetros de xIL33 hAb

Patrón	Temp. de crecimiento (Tg)	Temp. de producción (Tp)	pH	OUR objetivo	Título (g/l)
-++-	34	30	6,7	1,9	2,7
--++	30	30	6,7	2,8	1,7
+--+	30	30	7,3	1,9	3,2
0000	32	27,5	7,0	2,3	4,1
-+-+	34	25	6,7	2,8	3,0
+--+	30	25	7,3	2,8	3,3
++--	34	25	7,3	1,9	3,2
0000	32	27,5	7,0	2,3	4,0
++++	34	30	7,3	2,8	2,6
----	30	25	6,7	1,9	2,5

Como se muestra en la Tabla 5-1, la Tg varió de 30 a 34 °C, la Tp varió de 25 a 30 °C, el pH varió entre 6,7 y 7,3, y el punto de ajuste de la OUR varió de 1,9 a 2,8 mmol O₂/L/min. La **figura 41** muestra que las condiciones del punto central proporcionaron el beneficio más significativo con respecto al título, siendo el título más alto alcanzado 4,0 ± 0,05 g/l, lo que equivale a un aumento adicional en el título de hAb en comparación con las condiciones operativas del caso base (**figura 40**). Las mejores condiciones de cultivo incluyeron un pH de 7,0, una Tg de 32 °C, una Tp de 27,5 °C (ascenso de 2 h), y una OUR objetivo de aproximadamente 2,3 mmol/l/min (ascenso de la velocidad de agitación de 2 h).

Ejemplo 6: Optimización de FkpA

En un esfuerzo por optimizar los niveles de expresión de FkpA, se probaron dos variantes TIR de FkpA adicionales en los plásmidos individuales para xIL13, xIL17 y xIL33 hAb (plásmidos MD157, MD341 y MD501). Las variantes TIR de FkpA se caracterizaron como se describe en comparación con la secuencia señal endógena de FkpA (**figura 42**). Los plásmidos MD157, MD341 y MD501 incorporaron el ORF para FkpAc13, que se correlacionó con una fuerza de TIR de tres (**figura 43**). En los plásmidos individuales MD157, MD341 y MD501, el ORF de FkpAc13 se reemplazó por el ORF TIR1 o TIR2 de FkpA y se probó en las condiciones de fermentación optimizadas previamente identificadas para

cada hAb.

Los niveles aumentados de expresión de FkpA se correlacionaron con un aumento en la acumulación de xIL13 hAb (**figura 44**). Las condiciones TIR1 y TIR2 de FkpA dieron como resultado cantidades finales de FkpA de 0,5 y 2,5 g/l y títulos de xIL13 hAb de 1,5 y 2,5 g/l, respectivamente. La condición TIR 3 produjo 4 g/l de FkpA y 3,8 g/l de hAb. Los niveles de expresión de FkpA también tuvieron un impacto en los perfiles de la OUR de la fase de producción. En general, la titulación de FkpA aumentó la cantidad de hAb producida en aproximadamente 3 veces.

En las fermentaciones de xIL33 hAb, el perfil de acumulación de título más bajo se correlacionó con la condición TIR1 de FkpA con un final del título de ciclo de 2,4 g/l (**figura 45**). Las condiciones TIR2 y TIR3 de xIL33 dieron como resultado un aumento de aproximadamente 2 veces en el título de xIL33 hAb (**figura 45**) en comparación con la condición TIR1. Los datos sugieren que niveles elevados de FkpA son beneficiosos para la producción de hAb.

En las fermentaciones de xIL17 hAb, el perfil de acumulación de título más bajo se correlacionó con la condición TIR1 de FkpA con un final del título de ciclo de 2,0 g/l (**figura 46**).

Se probaron dos variantes TIR de FkpA adicionales (TIR2.3 y TIR6) usando las mejores condiciones descritas anteriormente para el xIL13 hAb. El perfil del título de TIR2.3 mostró una tendencia más alta que la condición TIR2 previamente probada, pero todavía era más baja que la condición TIR3 de control (**figura 47A**). La condición TIR6 dio como resultado un perfil de acumulación de título similar a la condición TIR 2.3, pero de nuevo más bajo que el control TIR3. La acumulación de FkpA determinada por análisis de transferencia de Western mostró la titulación de FkpA a través de las variantes TIR (**figura 47B**). Los datos sugieren que existe una cantidad óptima de expresión de FkpA que se correlaciona con la producción de hAb, que en el caso del xIL13 hAb (plásmido individual MD157) es TIR3.

Ejemplo 7: Efecto de las condiciones de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR)

Las mejores condiciones de xIL13 hAb identificadas en el Ejemplo 3 también se probaron con una segunda estrategia de OTR. En los experimentos (N = 3), la contrapresión del recipiente (BP) y las tasas de rociado se redujeron de 1,0 a 0,3 bar y de 20 a 13 SLPM, respectivamente. En un esfuerzo por recuperar la pérdida de OTR debido a las disminuciones en la contrapresión y la tasa de rociado, las velocidades de agitación de la fase de crecimiento y producción se aumentaron de 650 a 880 RPM y de 475 a 650 RPM. Se pueden usar diferentes combinaciones de contrapresión del recipiente, tasas de rociado, y velocidades de agitación para lograr condiciones de OTR similares a las citadas en ejemplos anteriores.

Las fermentaciones se realizaron con una BP constante durante la totalidad del proceso de fermentación. En las condiciones de OTR alteradas, la contrapresión se mantuvo a 0,3 bar (N = 3), y en las condiciones de control, la contrapresión se mantuvo a 1,0 bar (N = 5). Las fermentaciones se realizaron con un flujo de aire constante durante todo el proceso de fermentación. En las condiciones de OTR alteradas, el flujo de aire se mantuvo a 13 SLPM (N = 3) y en las condiciones de control, el flujo de aire se mantuvo a 20 SLPM (N = 5). Las fermentaciones implementaron un cambio de agitación a 150 de DO₅₀ tanto en las condiciones de OTR alteradas como de control. En las condiciones de OTR alteradas, la velocidad de agitación inicial se ajustó a 880 RPM y se cambió a 650 RPM, y en las condiciones de control, la velocidad de agitación inicial se ajustó a 650 RPM y se cambió a 475 RPM.

El aumento en la velocidad de agitación compensó la caída en la OTR debido a las reducciones en el rociado y la contrapresión. Las condiciones de OTR alteradas dieron como resultado OUR máximas y de la fase de producción (**figura 48A**) y perfiles de crecimiento (**figura 48B**) similares con respecto a la condición de control. La condición de OTR alterada dio como resultado un perfil de acumulación y un título máximo similares (4,1 ± 0,4 g/l) a la condición de control (**figura 49**).

Ejemplo 8: Optimización de la producción de ImmTAC

Los receptores de linfocitos T monoclonales de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC) son polipéptidos bicatenarios de la presente divulgación que son potencialmente útiles para varias terapias contra el cáncer (véanse, por ejemplo, Oates y Jakobsen, *Oncolmmunology* 2:e22891, 2013, y Liddy *et al.*, *Nat. Med.* 18:908-7, 2012). Al igual que los anticuerpos multispecíficos, la producción de ImmTAC para uso terapéutico requiere la capacidad de producir los componentes básicos, tal como las cadenas de TCR alfa y beta y cualquier polipéptido fusionado a las mismas (por ejemplo, efectores anti-CD3 tales como scFv), a escala industrial. Para satisfacer esta demanda, los vectores de expresión y las etapas del proceso se optimizaron para producir aumentos significativos en la producción con respecto a los métodos estándar. Es importante destacar que al igual que los Ejemplos anteriores, se encontró que la expresión de FkpA, los cambios de proceso, la optimización de TIR, y la expresión de DsbC proporcionaron estos aumentos en la producción de múltiples ImmTAC.

Materiales y métodos

Para los vectores de expresión de ImmTAC (**figura 50A**), se evaluaron combinaciones TIR de 1,1; 1,2; y 2,3. Como se usa en el presente documento con referencia a la producción de ImmTACS, el primer número representa la fuerza de TIR de la cadena alfa y el segundo representa la fuerza de TIR de la cadena beta (**figura 50B**).

Los plásmidos se transformaron en una cepa huésped, 67A6, con el genotipo W3110 $\Delta jhuA \Delta phoA ilvG2096$ (Val^I) $\Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacIQ \Delta ompT \Delta menE degpS210A$.

5 Las fermentaciones iniciales se realizaron a una temperatura constante de 30 °C y pH 7,0 con un ascenso de agitación iniciada a las 24 horas durante el transcurso de 4 horas, y se dirigió a una OUR de aproximadamente 1,75 mmol/l/min.

Se construyó un plásmido compatible (pACYC, Novagen, Madison, WI) que contenía el ORF para FkpA, como se ha descrito anteriormente y en la Patente Europea N.º EP1356052 B1. La construcción del gen FkpA estaba bajo el control de un promotor tacII.

La construcción de los plásmidos compatibles con oxidorreductasa originales fue como se describe en la Patente Europea N.º EP1356052 B1 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 9). El cribado de las oxidorreductasas incluyó la expresión del plásmido compatible JJ141 (DsbC), JJ142 (DsbA) y JJ247 (DsbA/C) con el plásmido individual ImmTAC TIR1,1 FkpA. El promotor tac usado para impulsar la expresión de las oxidorreductasas no se indujo y se basó en la expresión con pérdidas del promotor.

Para ensayar el título de ImmTAC, se enviaron muestras de las fracciones solubles para su análisis mediante un ensayo de proteína L/RP. Este ensayo es un ensayo de HPLC bidimensional en el que la primera columna es una columna de afinidad que captura componentes de IgG que contienen una cadena ligera variable y la segunda columna es una columna de fase inversa. Se configuró una estación de trabajo de HPLC integral en el modo de columna dual. Los depósitos de disolvente fueron: Disolvente 1A, tampón de carga por afinidad, PBS; Disolvente 1B, tampón de elución por afinidad, TFA al 0,2 % en agua; Disolvente 2A, tampón acuoso de fase inversa, TFA al 0,1 % en agua; Disolvente 2B, tampón de elución orgánico de fase inversa, TFA al 0,08 % en acetonitrilo. La columna de afinidad era una columna empaquetada interna que utiliza proteína L purificada adquirida en Sigma Aldrich (CA, EE.UU.) acoplada a la resina activada POROS® AL adquirida en Life Technologies (CA, EE.UU.). Todos los procedimientos que involucraban la columna de afinidad se realizaron a temperatura ambiente.

La segunda columna era una columna de fase inversa de proteína HALO C4 (2,1 x 20 mm) adquirida en Mac-Mod (CA, EE.UU.). La temperatura de la columna de fase inversa se mantuvo a 80 °C.

La columna de afinidad se equilibró en tampón de carga y se cargó una muestra a un caudal de 2 ml/min. El flujo pasante se dirigió a desecharse. Después de cargar la muestra, la columna de afinidad se lavó con tampón de carga para reducir los componentes unidos no específicamente. A continuación, mediante el cambio de válvula, la columna de afinidad se conectó a la columna de fase inversa y se eluyó con tampón de elución a un caudal de 2 ml/min para transferir los componentes capturados por afinidad a la columna de fase inversa. Durante esta etapa de transferencia, el detector UV se ubicó después de la columna de afinidad y antes de la columna de fase inversa y, por lo tanto, se monitorizó la elución de la columna de afinidad (que se convirtió en la carga de la columna de fase inversa).

40 Después de la elución, la columna de afinidad se reequilibró posteriormente con tampón de carga.

La columna de fase inversa cargada se lavó con TFA acuoso al 0,1 %. El caudal se ajustó a 2 ml/min y se realizó un gradiente rápido del 5 % al 30 % de disolvente 2B (TFA al 0,08 % en ACN) seguido de un gradiente poco profundo al 34 % de disolvente 2B. La elución se completó mediante un gradiente al 100 % de disolvente 2B para la regeneración. A continuación, la columna de fase inversa se devolvió a las condiciones iniciales para reequilibrarse. El eluato de la columna se monitorizó a 280 y 214 nm. La cuantificación se realizó comparando las áreas pico integradas con las de los estándares de concentraciones conocidas basadas en la separación de la columna de fase inversa. El límite de cuantificación (LOQ) para este ensayo es de 0,0125 g/l.

50 **Resultados**

La fermentación inicial evaluó la construcción TIR1,1 (**figura 51**). Las condiciones fueron las siguientes: 30 °C, pH 7,0 y una OUR de aproximadamente 1,75 mmol O₂/l/min. La fermentación dio como resultado una acumulación de título de 10 mg/l. La acumulación total de subunidades alfa y beta fue de 550 y 800 mg/l, respectivamente (**figura 52**).

Para determinar el efecto de la expresión de chaperonas sobre los títulos de ImmTAC, se proporcionaron plásmidos para la expresión conjunta de chaperonas usando los vectores descritos anteriormente. Se probaron varias chaperonas conocidas en combinación con la expresión de ImmTAC, incluyendo la proteína FkpA, una peptidilproil cis-trans isomerasa con actividad chaperona.

A continuación, el plásmido compatible con FkpA se cotransformó con el plásmido de expresión TIR1,1 ImmTAC 1 descrito anteriormente (**figura 53**) en la cepa 67A6. Las condiciones de fermentación fueron idénticas a las utilizadas en la fermentación inicial descrita anteriormente y mostrada en la **figura 51**. El promotor tac de FkpA se indujo con IPTG 1 mM cuando el cultivo alcanzó 200 de DO₅₅₀. Las transferencias de Western solubles anti-alfa y anti-beta indicaron un aumento en la acumulación de subunidades solubles tanto alfa como beta (transferencia soluble reducida; **figura 54A**), además de en el ImmTAC ensamblado. El análisis de títulos también indicó un aumento de 2 veces en

el ImmTAC ensamblado en comparación con la condición sin chaperona, con un título final de 20 mg/l (**figura 54B**).

Las condiciones del proceso de fermentación se cambiaron en experimentos posteriores de ImmTAC (**figura 55**). En todas las fermentaciones posteriores, el ascenso de agitación se dirigió a un punto de ajuste de la OUR específico de aproximadamente 2,5 mmol O₂//min. Además, se realizó un cambio de temperatura a las 24 horas que redujo la temperatura de crecimiento de 30 °C a una temperatura de producción de 25 °C.

Las condiciones del proceso alteradas se probaron usando el sistema compatible con FkpA descrito anteriormente e incluían la adición de IPTG 1 mM a 200 de DO₅₅₀. El uso de las condiciones del proceso alteradas dio como resultado un aumento aproximado de 2 veces en el título en comparación con las condiciones del proceso anterior con un título final de 40 mg/l (**figura 57**).

Para el ImmTAC TIR1,1; TIR1,2; y TIR2,3, se construyó un plásmido que codificaba las cadenas alfa y beta de ImmTAC y FkpA y se usó para transformar 67A6 (**figura 58**). En estas construcciones plasmídicas, el ORF de FkpA estaba aguas arriba del ORF alfa y un promotor *phoA* controlaba la transcripción. El plásmido pBR322 se mantiene normalmente a aproximadamente 30 copias/célula (Bolívar *et al.*, *Gene*, 2:95-113, 1977), y el plásmido pACYC se mantiene normalmente a aproximadamente 15 copias/célula (Chang y Cohen, *J. Bacteriol.*, 134:1141-1156, 1978). Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que un aumento en el número de copias cuando FkpA se mueve sobre el plásmido de expresión de ImmTAC puede dar como resultado un aumento en la cantidad de FkpA producida.

Los tres plásmidos individuales de variantes TIR de ImmTAC que incorporaban el ORF de FkpA dieron como resultado títulos más altos que el sistema de FkpA compatible con TIR1,1 descrito previamente. Las condiciones TIR1,2 y TIR2,3 dieron como resultado títulos de aproximadamente 50 mg/l cada uno (**figura 59A**), mientras que la condición TIR1,1 dio como resultado un título de 65 mg/l (**figura 59A**). La acumulación total de subunidades alfa y beta para la condición TIR2,3 fue de 2,5 y 5,5 g/l, respectivamente (**figura 59B**). En la condición TIR1,1, la acumulación total de subunidades alfa y beta fue de 1 g/l y 2,5 g/l, respectivamente. En la condición TIR1,2, la acumulación de subunidades alfa y beta fue de aproximadamente 0,8 g/l y 3,2 g/l, respectivamente (**figura 59B**).

La comparación del plásmido individual TIR1,1 y los sistemas plasmídicos compatibles con TIR1,1 con respecto a la expresión de FkpA soluble (ensayado por transferencia de Western) indicó que el sistema plasmídico individual dio como resultado un aumento en la cantidad de FkpA producida (**figura 60A**). El aumento de FkpA soluble dio como resultado un aumento adicional en el título en comparación con el sistema plasmídico compatible anterior y logró un título final de 65 mg/l (**figura 60B**).

De manera similar al sistema plasmídico compatible descrito para la expresión conjunta de FkpA, se utilizaron plásmidos compatibles para cribar diversas oxidoreductasas conocidas en combinación con el TIR1,1 ImmTAC 1 que incorporó el ORF de FkpA descrito anteriormente (**figura 61**). La expresión conjunta de DsbA en solitario y DsbA en combinación con DsbC dio como resultado una disminución similar en el título de 20 mg/ml en comparación con la condición anterior de solo FkpA. Sin embargo, la expresión conjunta de DsbC en solitario dio como resultado un título de 80 mg/l, que correspondía a un aumento de 15-20 mg/l en la producción de ImmTAC ensamblado (**figura 62**). El aumento en el título ensamblado en el plásmido individual TIR1,1 con la expresión conjunta de DsbC condujo a la hipótesis de que el aumento de la acumulación de subunidades observada en la condición TIR2,3 individual de FkpA anterior puede proporcionar un beneficio adicional al pegamiento y ensamblaje de las subunidades individuales y puede aumentar aún más los títulos. El plásmido individual TIR2,3 FkpA se probó con el sistema compatible con DsbC (N = 4) y dio como resultado un título promedio de 110 mg/l (**figura 63**).

Es importante destacar que la optimización de las TIR de las subunidades alfa y beta, junto con la expresión conjunta de las chaperonas FkpA y DsbC y las condiciones mejoradas del proceso descritas anteriormente (**figura 55**), dio como resultado un aumento de 10 veces en el título de ImmTAC 1 (**figura 64**). Las etapas de optimización para la producción de ImmTAC 1 incluyeron la expresión conjunta de FkpA, cambios del proceso (aumento de la OUR, pH más básico, cambio de temperatura), un sistema plasmídico individual con FkpA e ImmTAC 1, expresión de DsbC con pérdidas, y aumento de la fuerza de TIR.

Las optimizaciones anteriores se evaluaron usando ImmTAC 1. Se probó un segundo ImmTAC distinto, ImmTAC 2, usando las mismas optimizaciones. Como se muestra en la **figura 65A** (transferencia de cadena alfa) y la **figura 65B** (transferencia de cadena beta), las mismas condiciones de ImmTAC TIR y chaperona proporcionan el mayor beneficio al ImmTAC 2 ensamblado.

En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión conjunta de FkpA junto con DsbC y las mejoras clave del proceso aumentan la producción de ImmTAC ensamblado, utilizando múltiples construcciones de ImmTAC para confirmar estos efectos.

SECUENCIAS

Todas las secuencias de polipéptidos se presentan del extremo N-terminal a C-terminal a menos que se indique de otro modo. Todas las secuencias de polinucleótidos se presentan de 5' a 3' a menos que se indique de otro modo.

ES 2 819 256 T3

FkpA TIR1

GAATTATGAA GTC CCTGTTT AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:1)

5

FkpA TIR2

GAATTATGAA GTCGCTATTC AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:2)

10

FkpA TIR3 (cl3)

GAATTATGAA GTCGCTGTTT AAAGTTACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:3)

15

Péptido señal FkpA
MKSLFKVTLLATTMAVALHAPITFA
(SEQ ID NO: 4)

LISTA DE SECUENCIAS

20

<110> GENENTECH, Inc.
GIULIANOTTI, James
REILLY, Dorothea
AURORI, Kieran
SIMMONS, Laura

25

<120> MÉTODOS PARA PRODUCIR PROTEÍNAS BICATENARIAS EN BACTERIAS

<130> 146392035140

30

<140> Todavía sin asignar
<141> Simultáneamente con la presente

<150> US 62/075.798
<151> 05-11-2014

35

<160> 4

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

40

<210> 1
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 1

50

gaattatgaa gtc CCTgTTT aaagtGAcgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cacttttgct 80

55

<210> 2
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

60

<400> 2

ES 2 819 256 T3

gaattatgaa gtcgctattc aaagtgacgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cacttttgct 80

5 <210> 3
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 3

gaattatgaa gtcgctggtt aaagttacgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cacttttgct 80

15 <210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

25 Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1 5 10 15
Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un receptor de linfocitos T monoclonal de movilización inmunitaria contra el cáncer (ImmTAC) que comprende una cadena alfa del receptor de linfocitos T (TCR) y una cadena beta de TCR en una célula huésped de *E. coli*, comprendiendo el método:
- (a) cultivar la célula huésped de *E. coli* para expresar la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR del ImmTAC en un medio de cultivo en condiciones que comprenden:
- una fase de crecimiento que comprende una temperatura de crecimiento y una velocidad de agitación del crecimiento, y
una fase de producción que comprende una temperatura de producción y una velocidad de agitación de producción,
por lo que, tras la expresión la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR, se pliegan y se ensamblan para formar un ImmTAC biológicamente activo en la célula huésped de *E. coli*;
en donde la célula huésped de *E. coli* comprende un polinucleótido que comprende:
- (1) una primera unidad de traducción que codifica la cadena alfa de TCR del ImmTAC;
(2) una segunda unidad de traducción que codifica la cadena beta de TCR del ImmTAC;
(3) una tercera unidad de traducción que codifica una peptidil-prolil isomerasa, en la que la peptidil-prolil isomerasa es una proteína FkpA; y
(4) una cuarta unidad de traducción que codifica una proteína disulfuro oxidoreductasa, en donde la proteína disulfuro oxidoreductasa es una proteína DsbC;
- en donde la temperatura de crecimiento está en el intervalo de 30 °C a 34 °C durante la fase de crecimiento, en donde la temperatura de producción está en el intervalo de 25 °C a 29 °C durante la fase de producción, en donde la velocidad de agitación del crecimiento es suficiente para lograr una velocidad máxima de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de crecimiento en el intervalo de 3,5 a 4,5 mmol/l/min, y en donde la velocidad de agitación de producción es suficiente para lograr una velocidad de consumo de oxígeno de la célula huésped durante la fase de producción en el intervalo de 1,0 a 3,0 mmol/l/min; y
- (b) recuperar el ImmTAC biológicamente activo de la célula huésped de *E. coli*.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido comprende además tres copias de un promotor, en donde una primera copia está en combinación operativa con la primera unidad de traducción, una segunda copia está en combinación operativa con la segunda unidad de traducción y una tercera copia está en combinación operativa con la tercera unidad de traducción para impulsar la transcripción de la primera cadena, la segunda cadena y la proteína FkpA, opcionalmente, en donde el promotor es un promotor inducible, opcionalmente, en donde el promotor inducible es un promotor inducible por IPTG que impulsa la transcripción de la cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR y la proteína FkpA en ausencia de inducción de IPTG y, opcionalmente, en donde el promotor inducible es un promotor Pho que impulsa la transcripción de la cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR y la proteína FkpA cuando el fosfato en el medio de cultivo se ha agotado.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polinucleótido comprende además un marcador seleccionable y el medio de cultivo comprende un agente de selección que consiste en un único antibiótico para hacer que la célula huésped de *E. coli* conserve el polinucleótido.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la primera unidad de traducción comprende una primera región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la cadena alfa de TCR, y la segunda unidad de traducción comprende una segunda región de inicio de la traducción (TIR) en combinación operativa con una región codificante de la cadena beta de TCR, en donde la fuerza de traducción relativa de la primera y la segunda TIR es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la proteína FkpA es FkpA de *E. coli*.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína DsbC es DsbC de *E. coli*.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la célula huésped de *E. coli* es una cepa con una mutación *degpS210A*.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la célula huésped de *E. coli* es una cepa con un genotipo de W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA \Delta ilvG2096$ (Val^I) $\Delta prc \Delta spr43H1 \Delta degP \Delta manA \Delta lacI^Q \Delta ompT \Delta menE \Delta degpS210$.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la cadena alfa de TCR comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR y un dominio constante de cadena alfa de TCR, y en donde la cadena beta de TCR comprende un dominio variable de cadena beta de TCR y un dominio constante de cadena beta de TCR.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que las dos cadenas del ImmTAC están unidas entre sí por al menos un enlace disulfuro.
- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el ImmTAC comprende además un fragmento de anticuerpo que se une a un linfocito T y activa una respuesta de linfocitos T, en donde, opcionalmente, el fragmento de anticuerpo comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-CD3.
- 10 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el ImmTAC comprende un TCR genomanipulado para poseer una mayor afinidad por un antígeno, en comparación con la afinidad por el antígeno de un TCR que no ha sido genomanipulado.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el ImmTAC se recupera del periplasma de la célula huésped de *E. coli*.
- 15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la velocidad de agitación del crecimiento es de un 10 % a un 40 % más alta que la velocidad de agitación de producción.

FIG. 1A

LC y HC totales

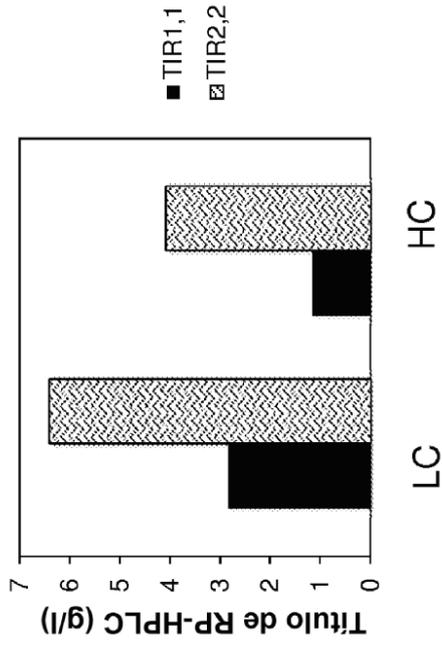


FIG. 1B

Total frente a Soluble

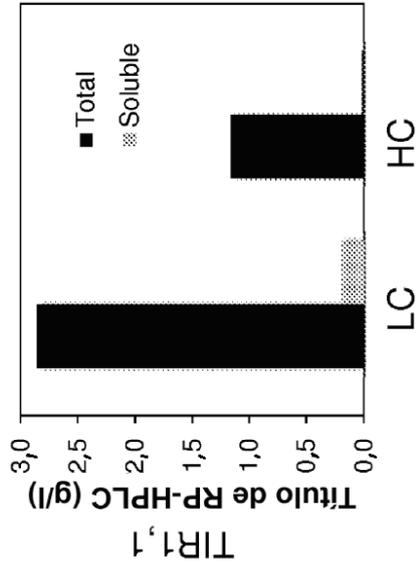
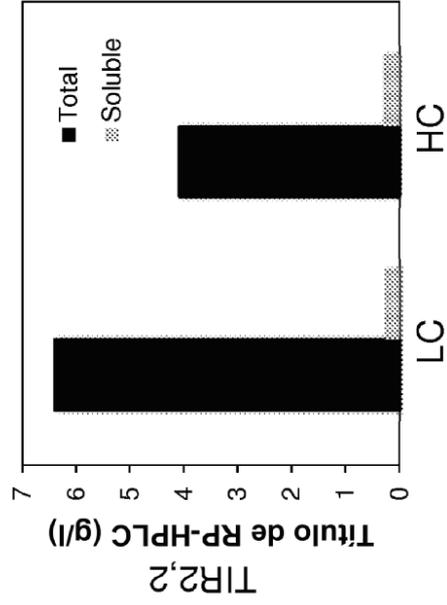


FIG. 1C

Total frente a Soluble



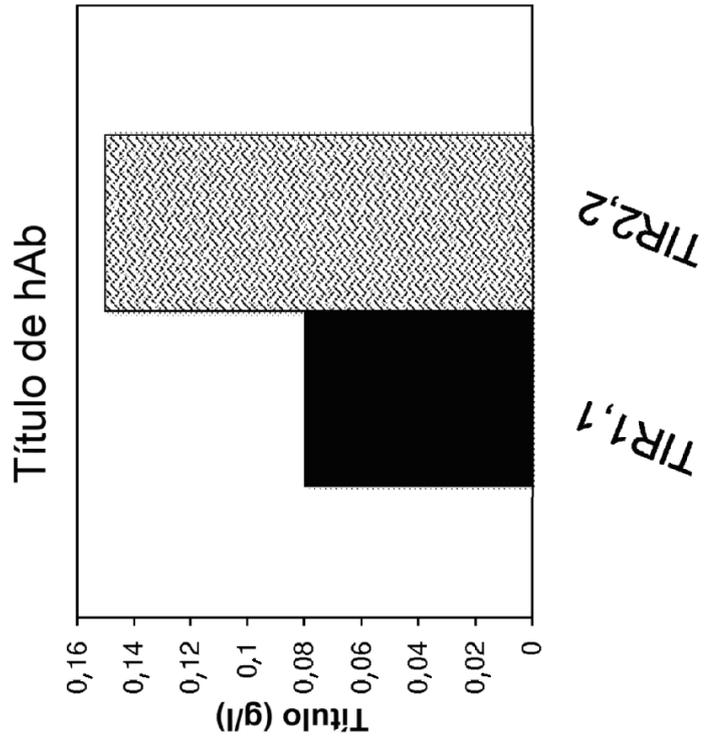
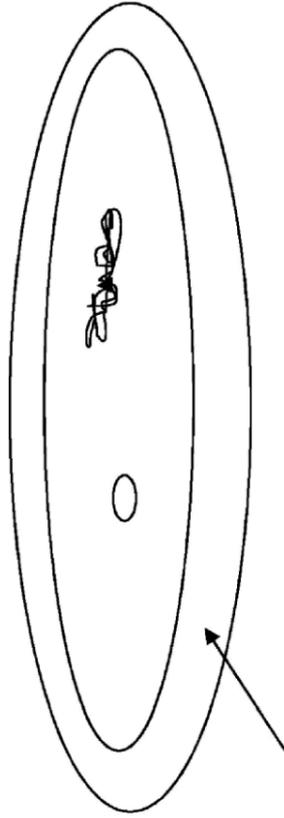


FIG. 2

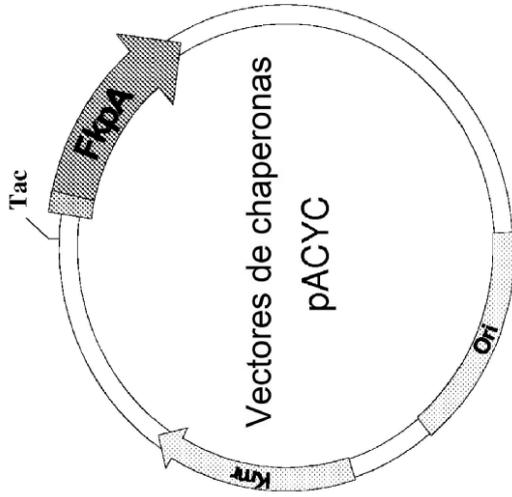
FIG. 3A



Periplasma Plegamiento/Ensamblaje = Chaperonas
 Plegamiento/Ensamblaje

FIG. 3B

Ppiasas:	Oxidorreductasas:	Chaperonas:
RotA	DsbA	Skp
SurA	DsbC	Spy
FkpA	DsbG	FkpA
		SurA



Compatible

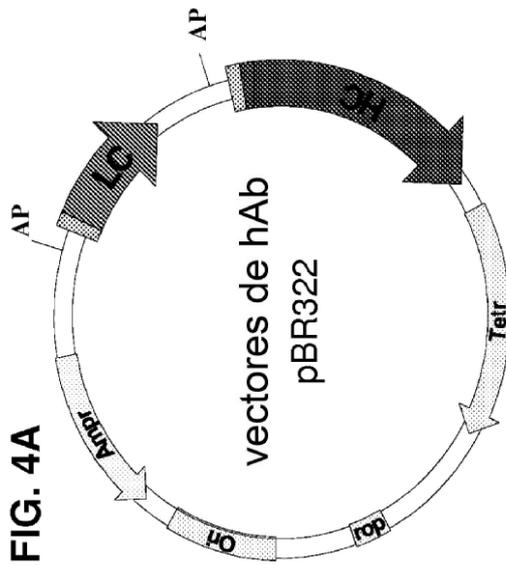
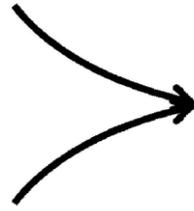
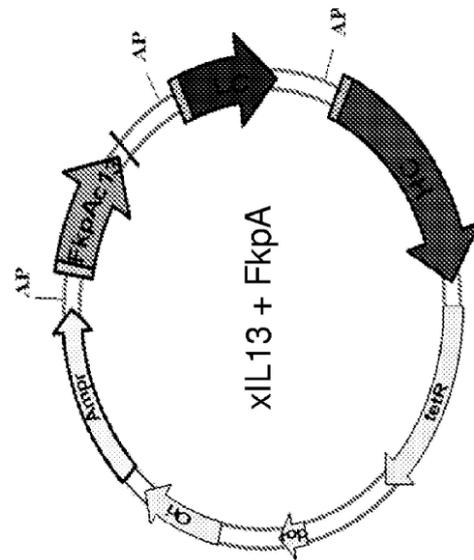


FIG. 4A



Individual

FIG. 4B

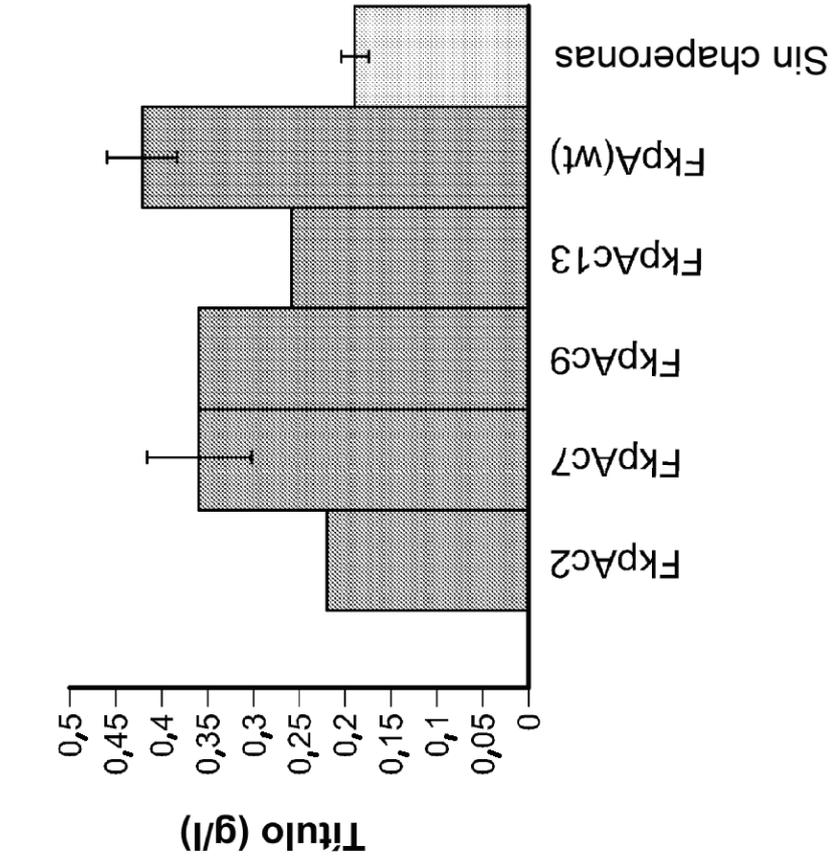
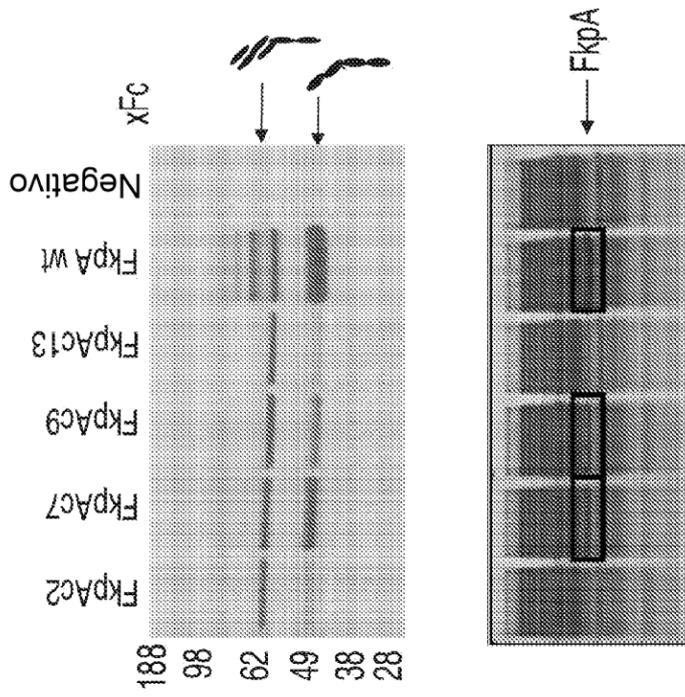


FIG. 5B



FkpA (wt) > FkpAc7 > FkpAc9 > FkpAc2 > FkpAc13

FIG. 5A

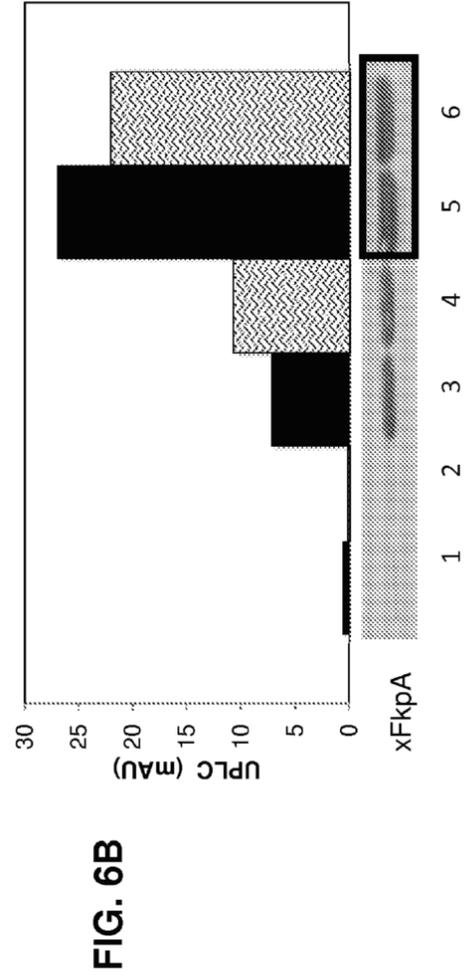
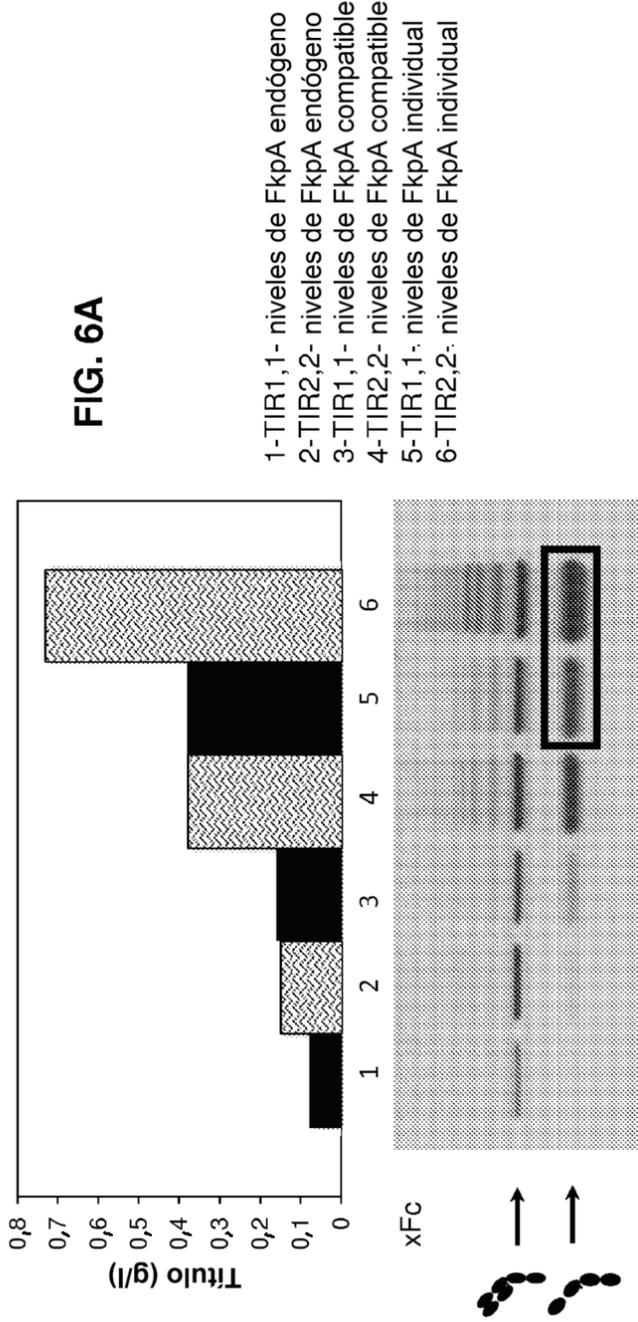


FIG. 7A

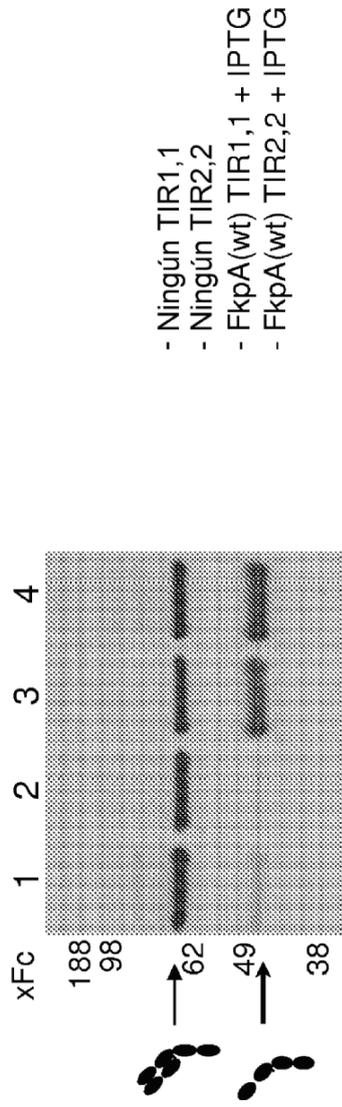
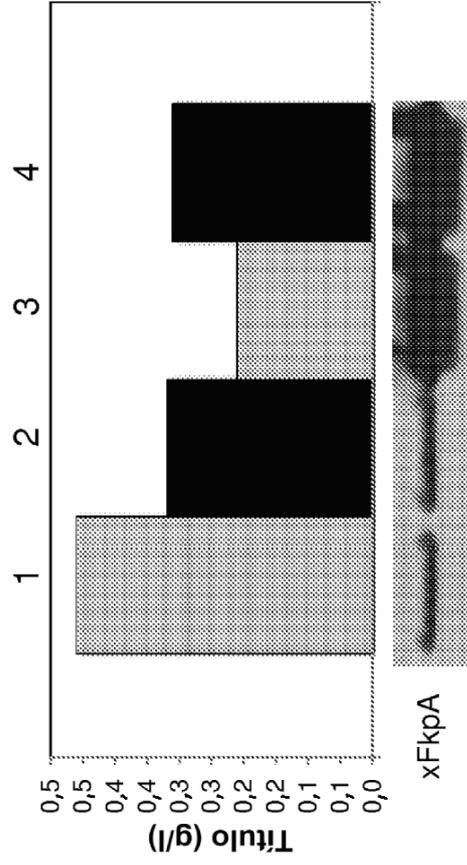
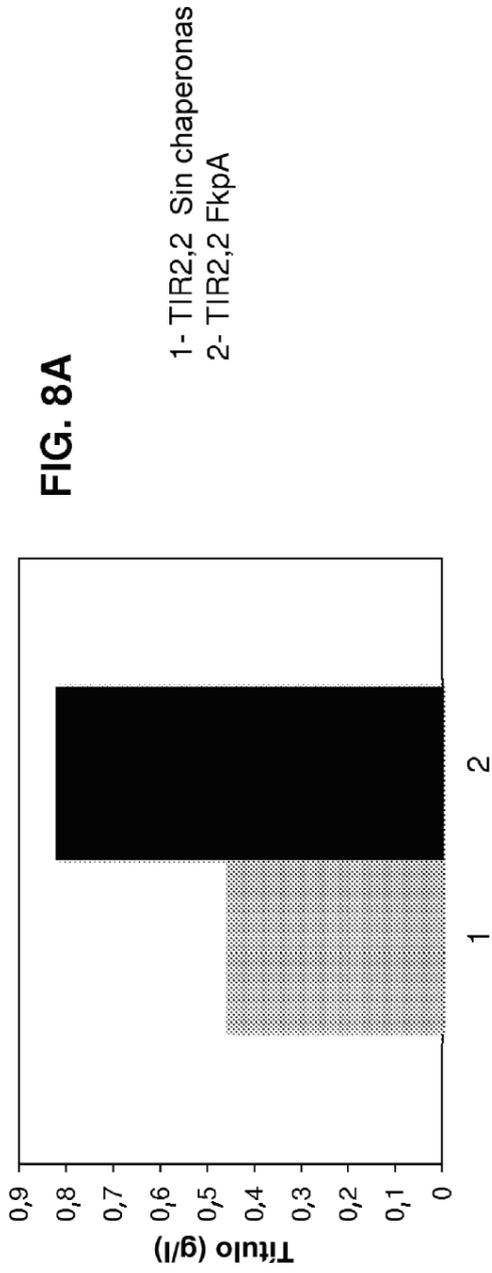
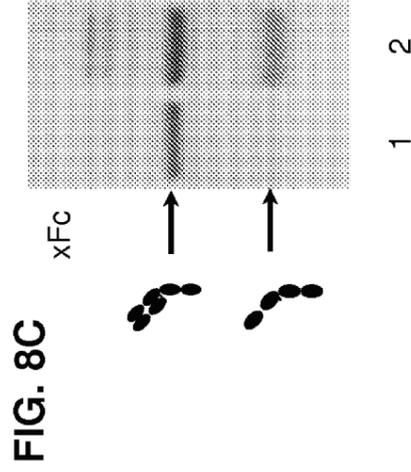
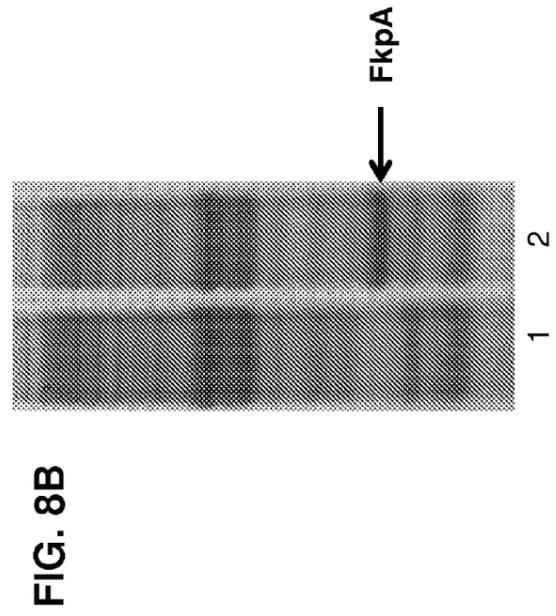


FIG. 7B





1- TIR2,2 Sin chaperonas
2- TIR2,2 FkpA



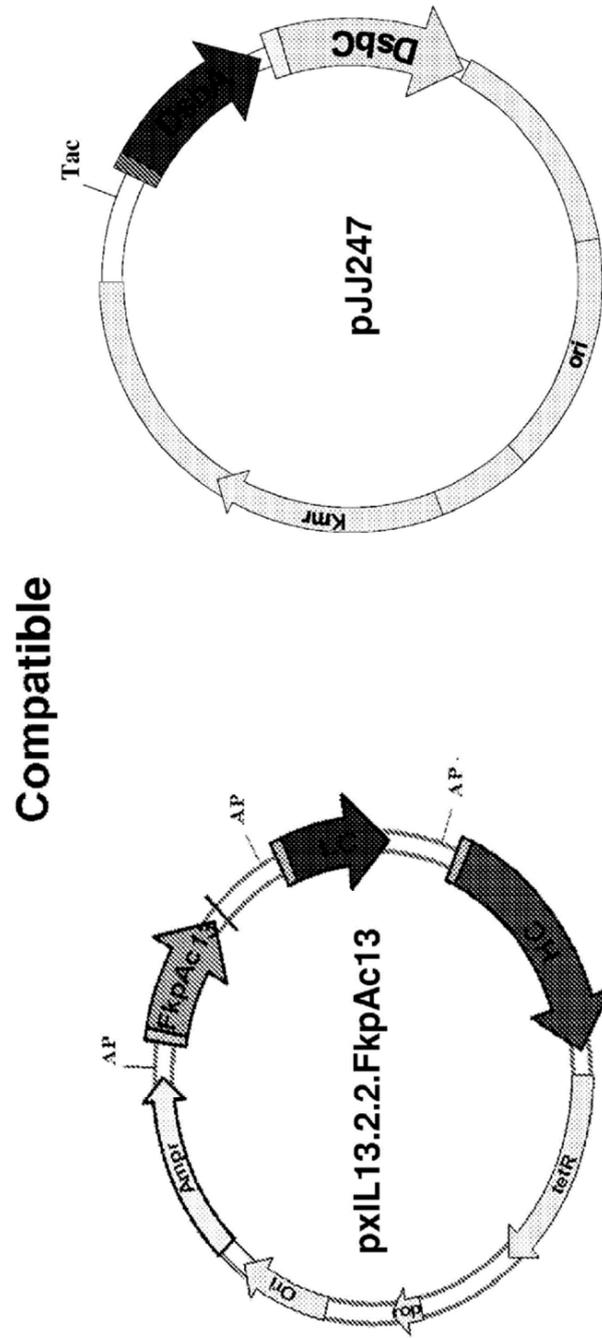


FIG. 9

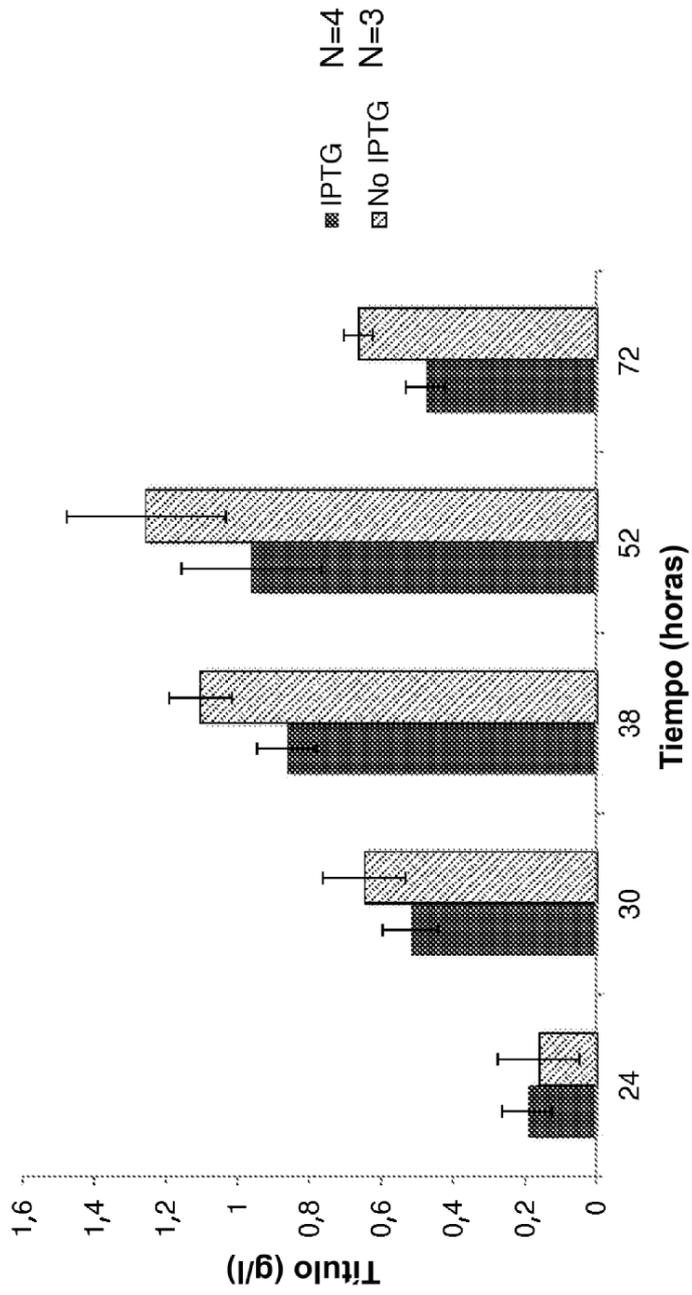
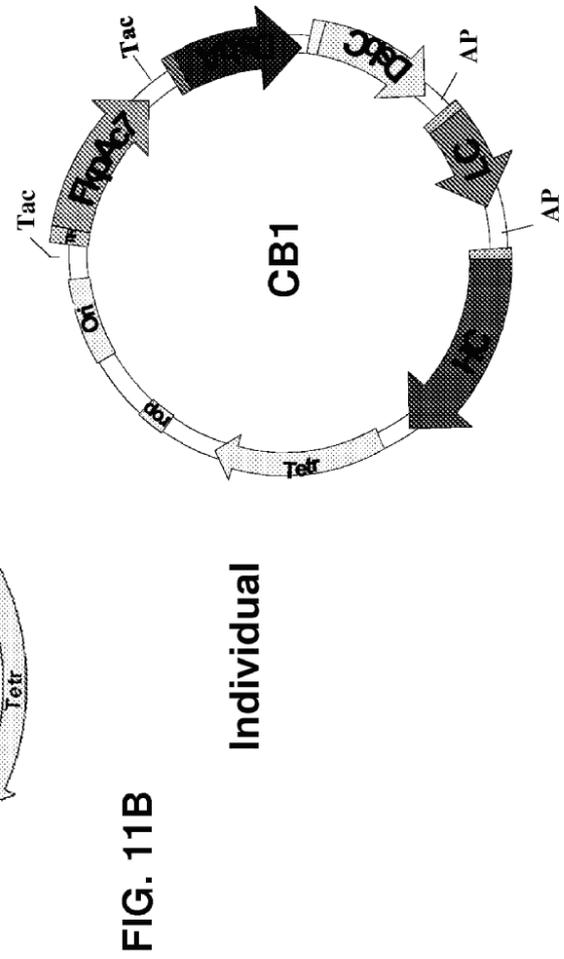
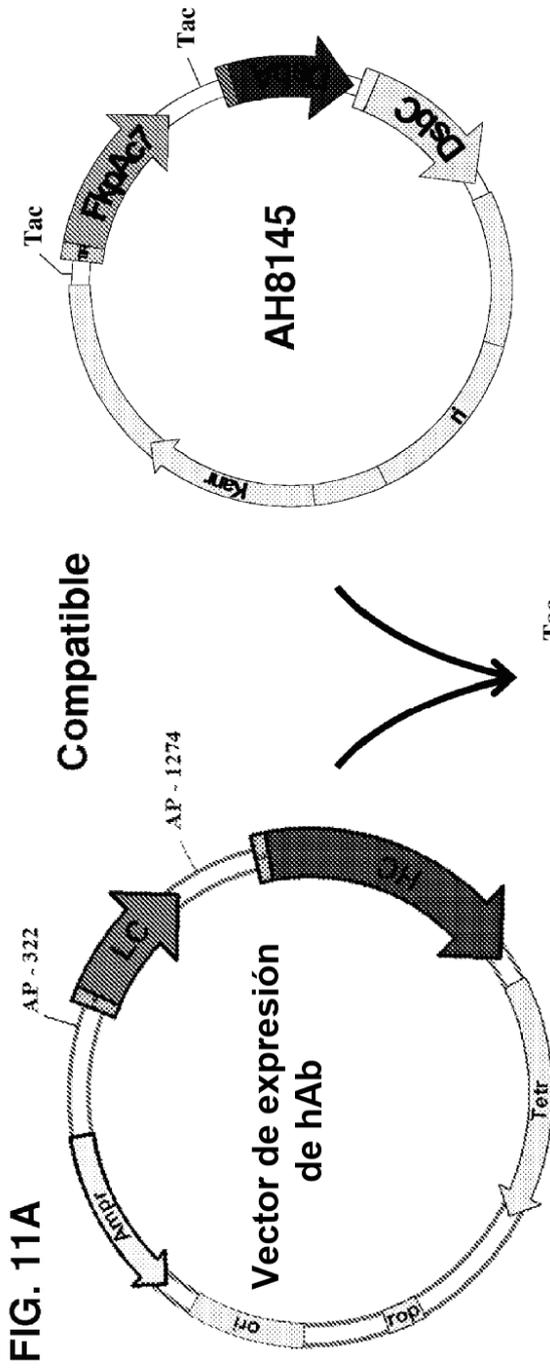
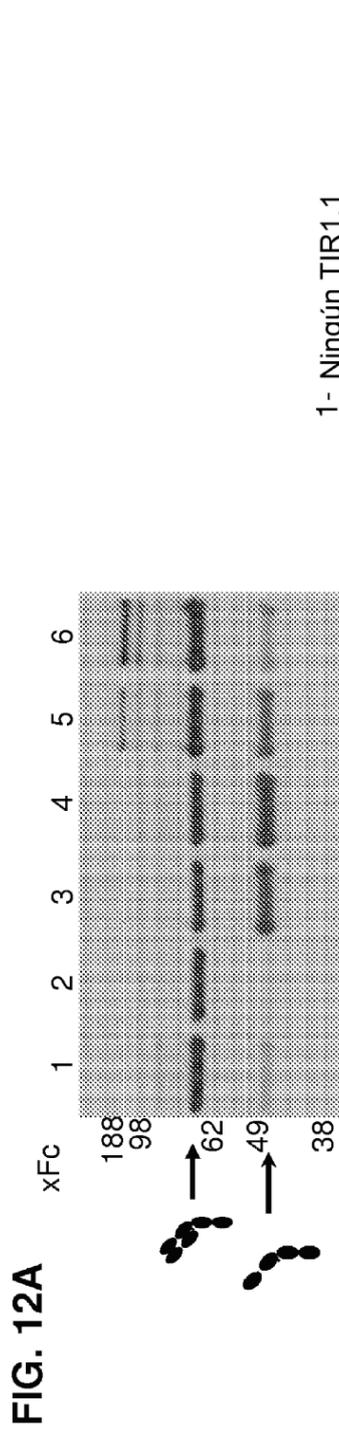
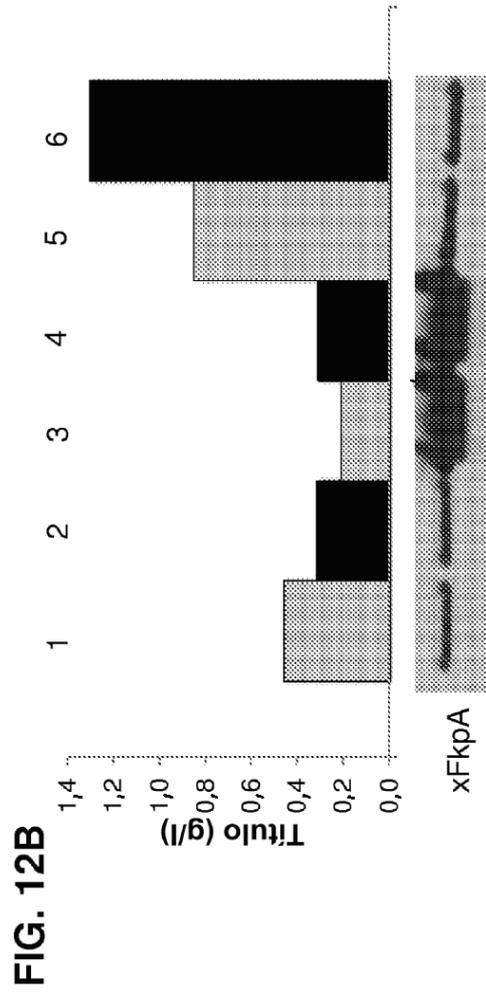


FIG. 10





- 1- Ningún TIR1,1
- 2- Ningún TIR2,2
- 3- FkpA(wt) TIR1,1 + IPTG
- 4- FkpA(wt) TIR2,2 + IPTG
- 5- DsbA/C/FkpA TIR1,1 - IPTG
- 6- DsbA/C/FkpA TIR2,2 - IPTG



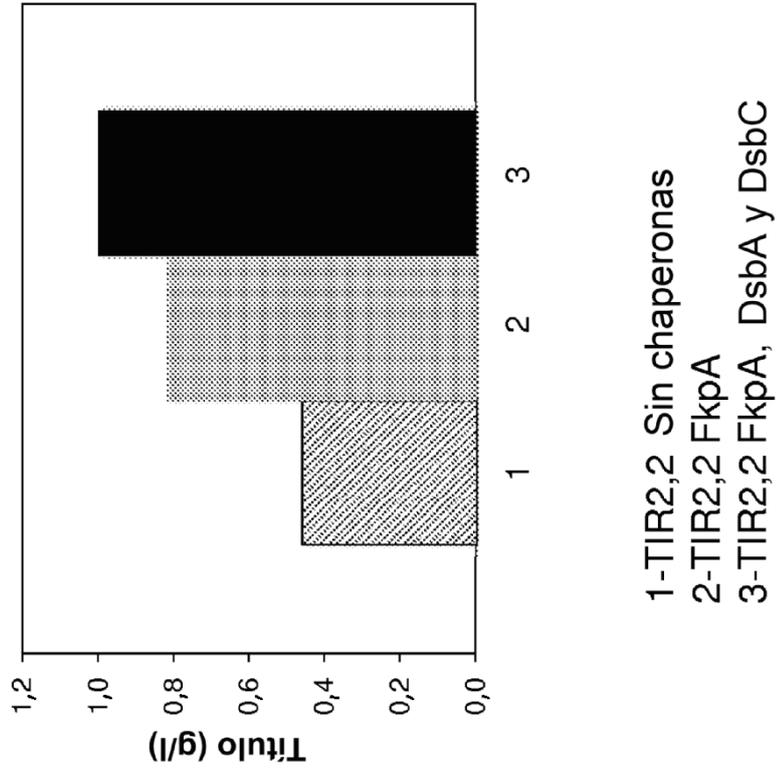


FIG. 13

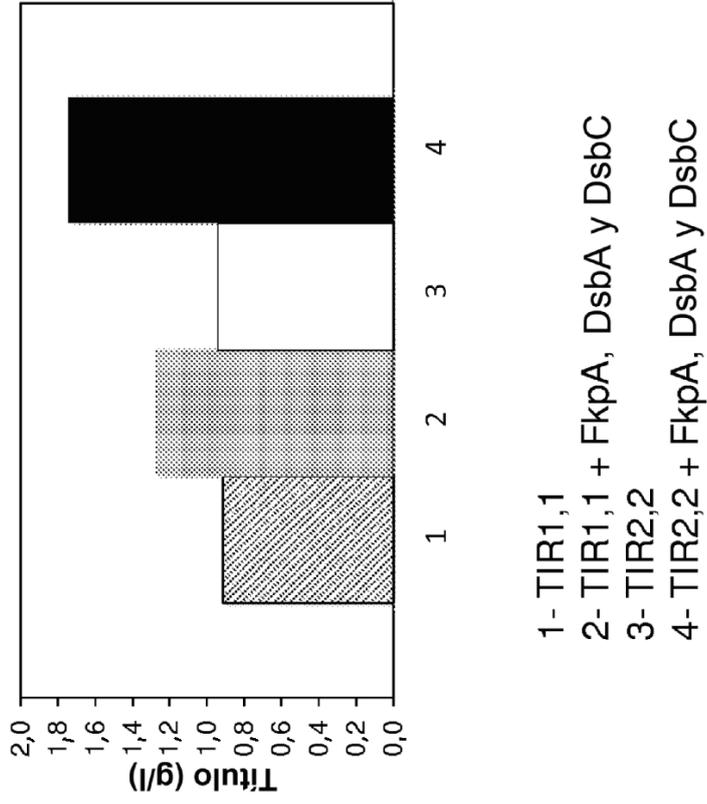


FIG. 14

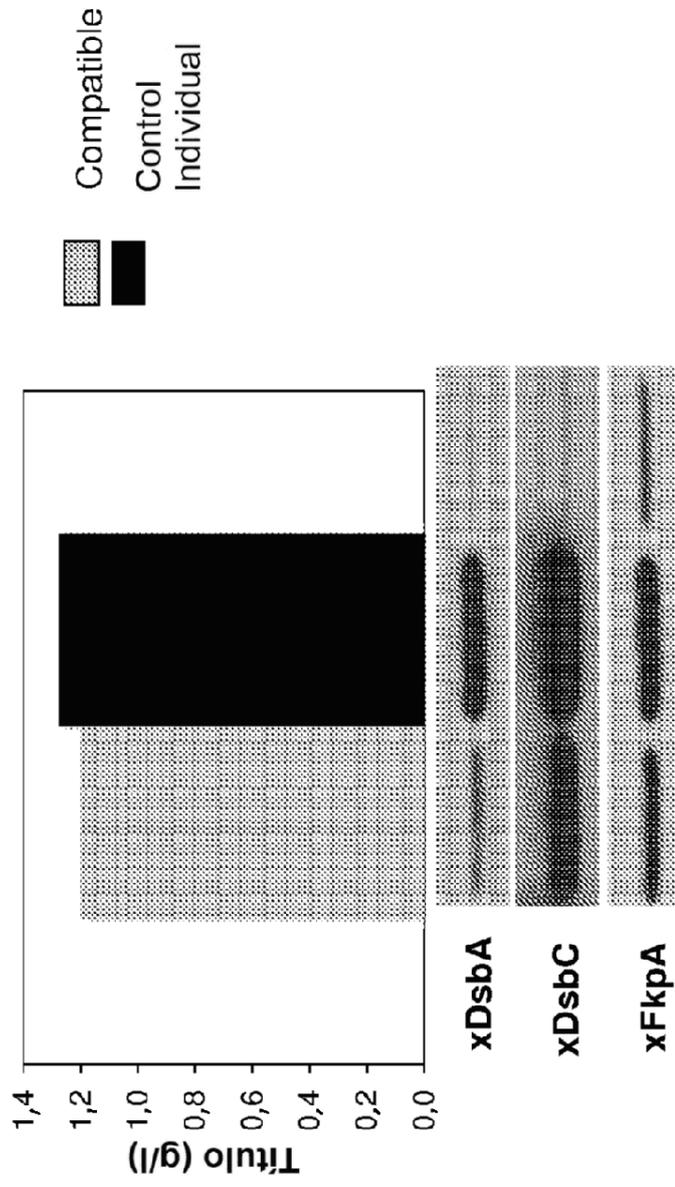
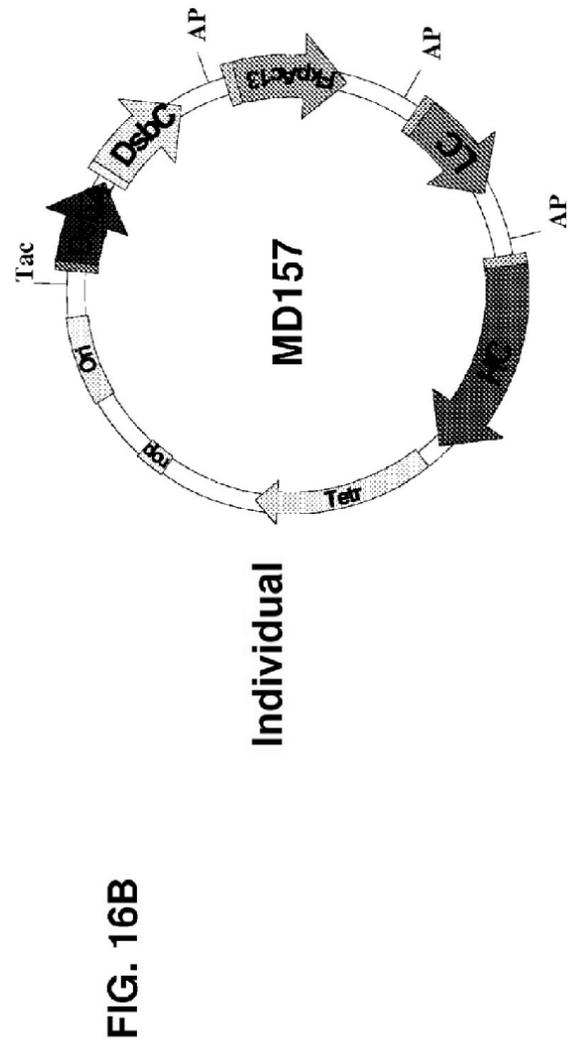
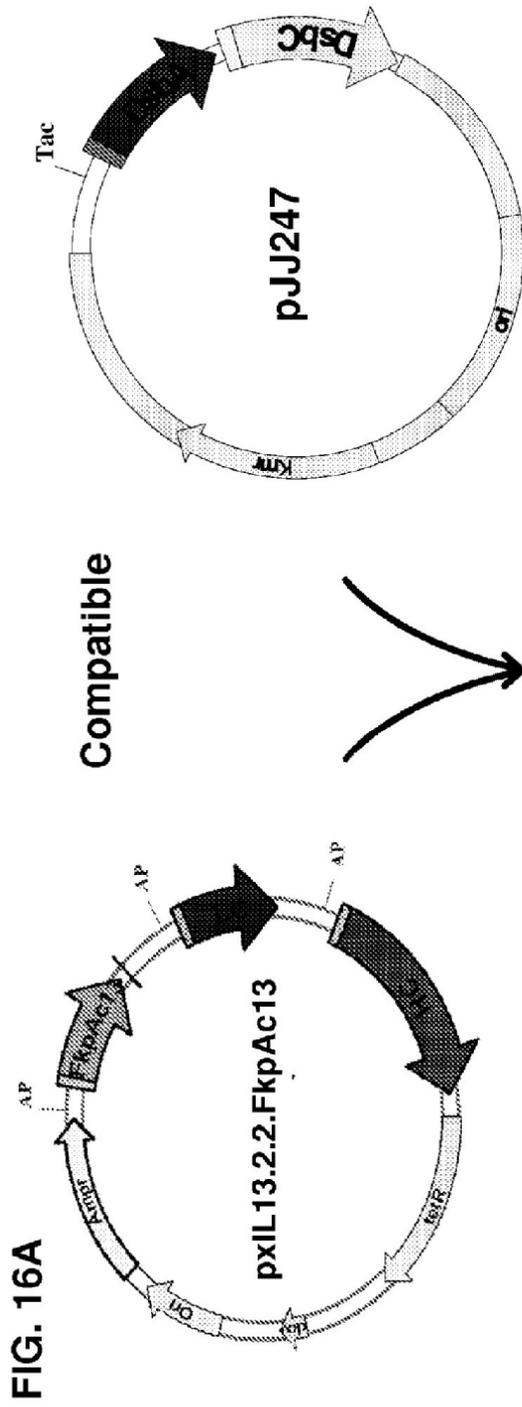


FIG. 15



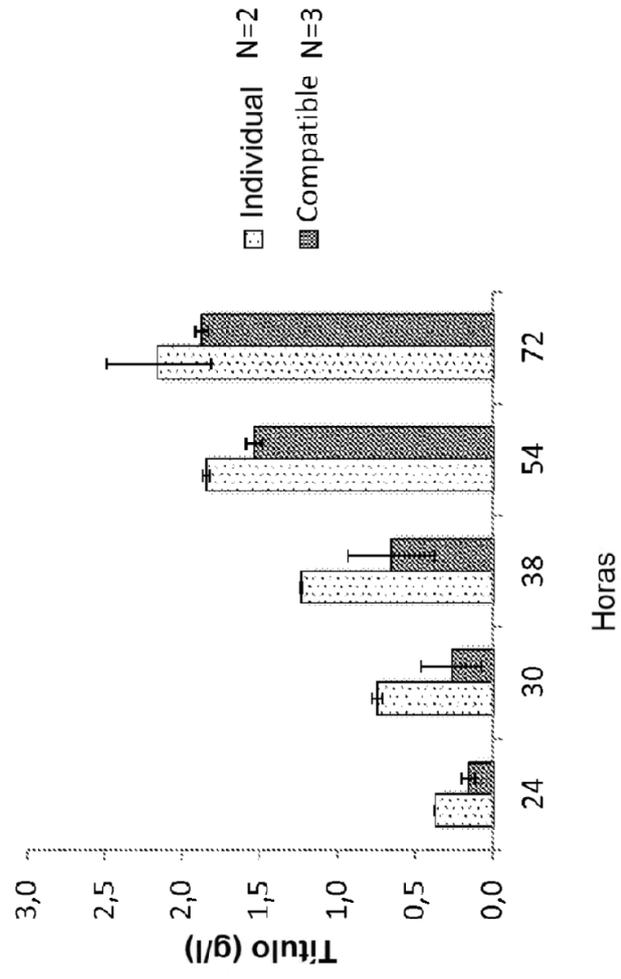


FIG. 17

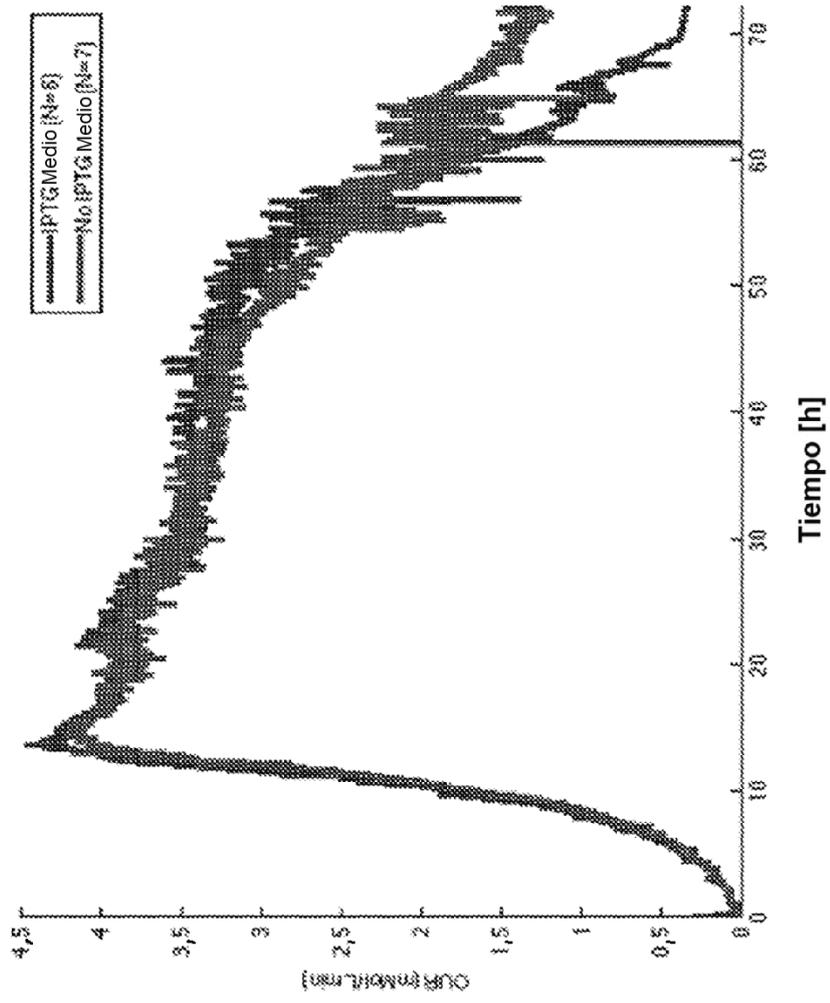


FIG. 18

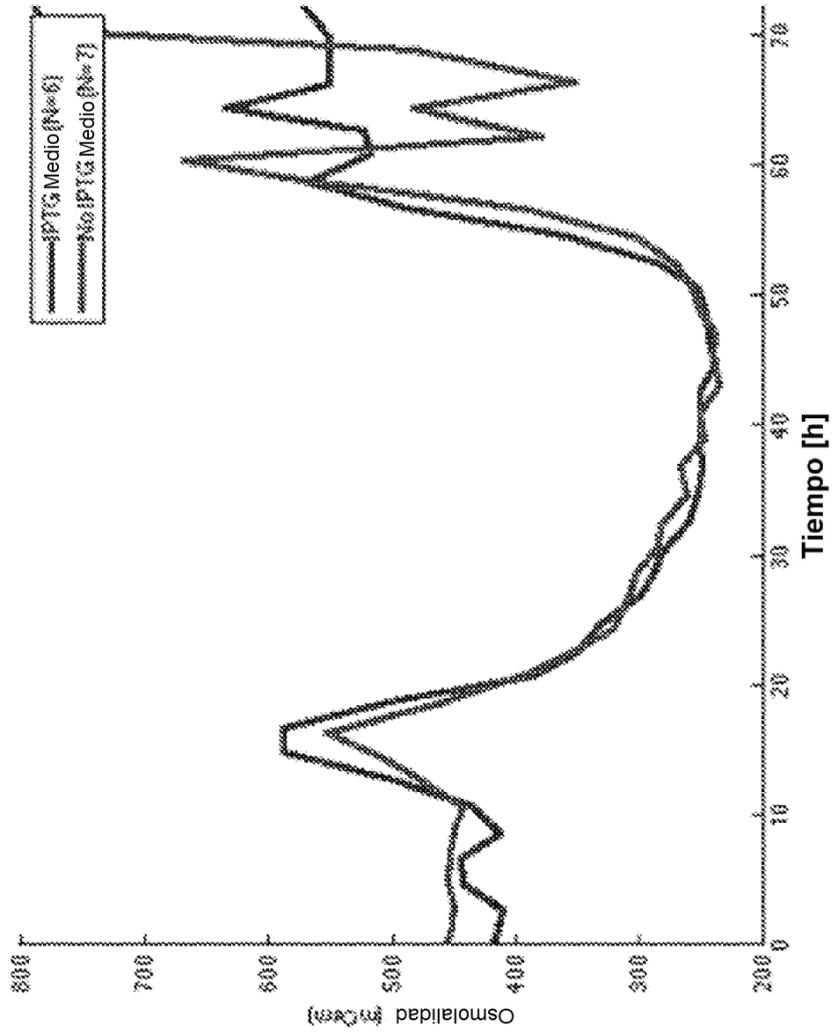


FIG. 19

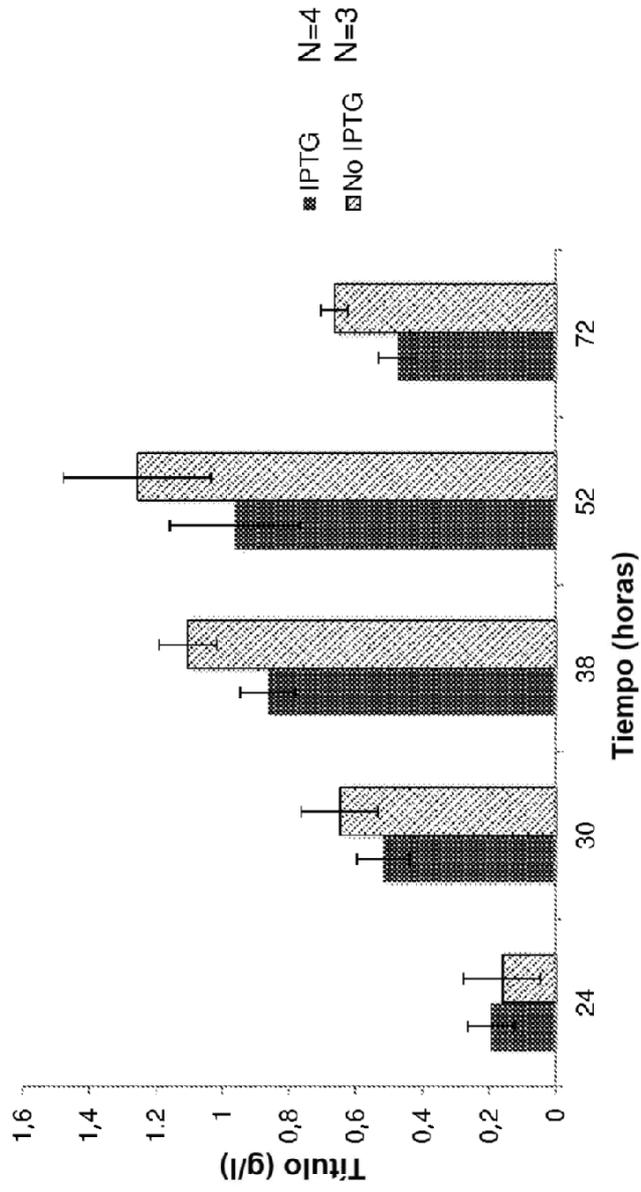


FIG. 20

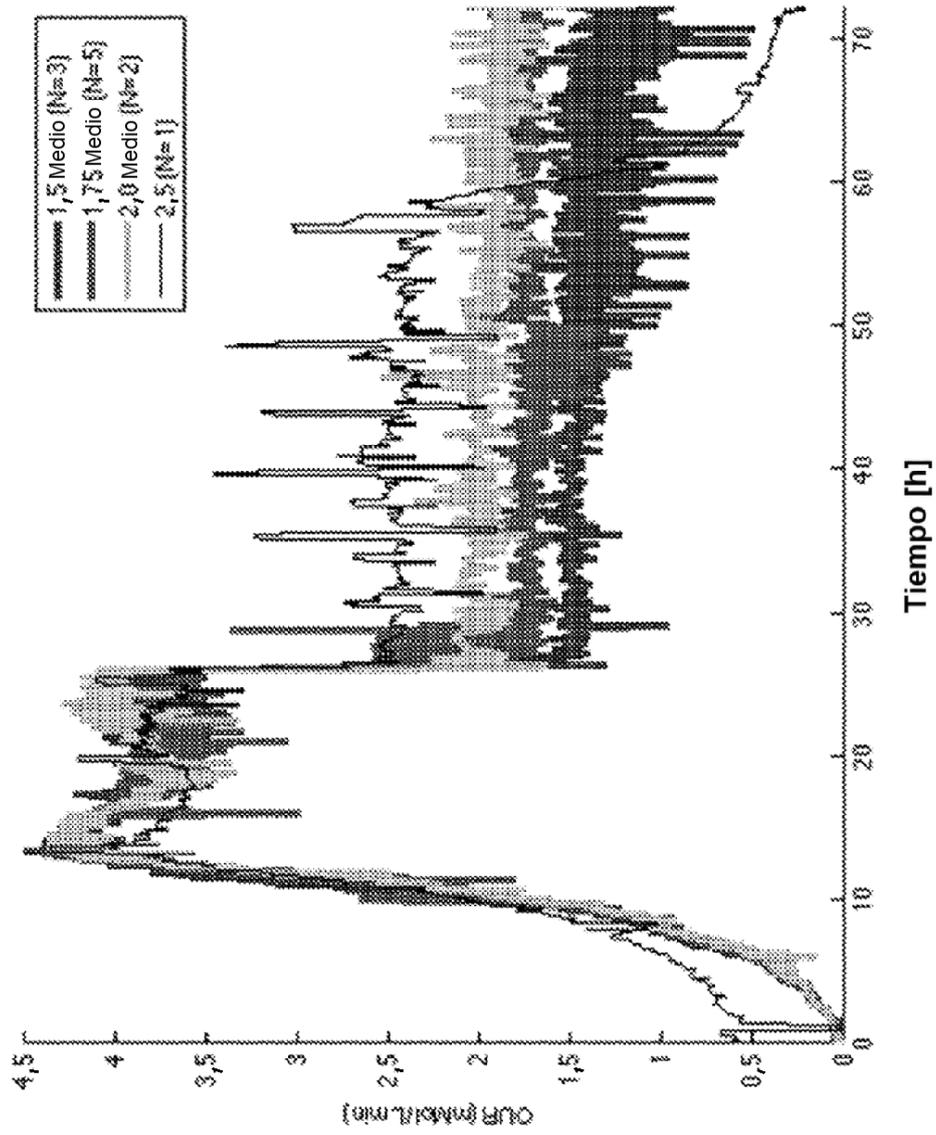


FIG. 21

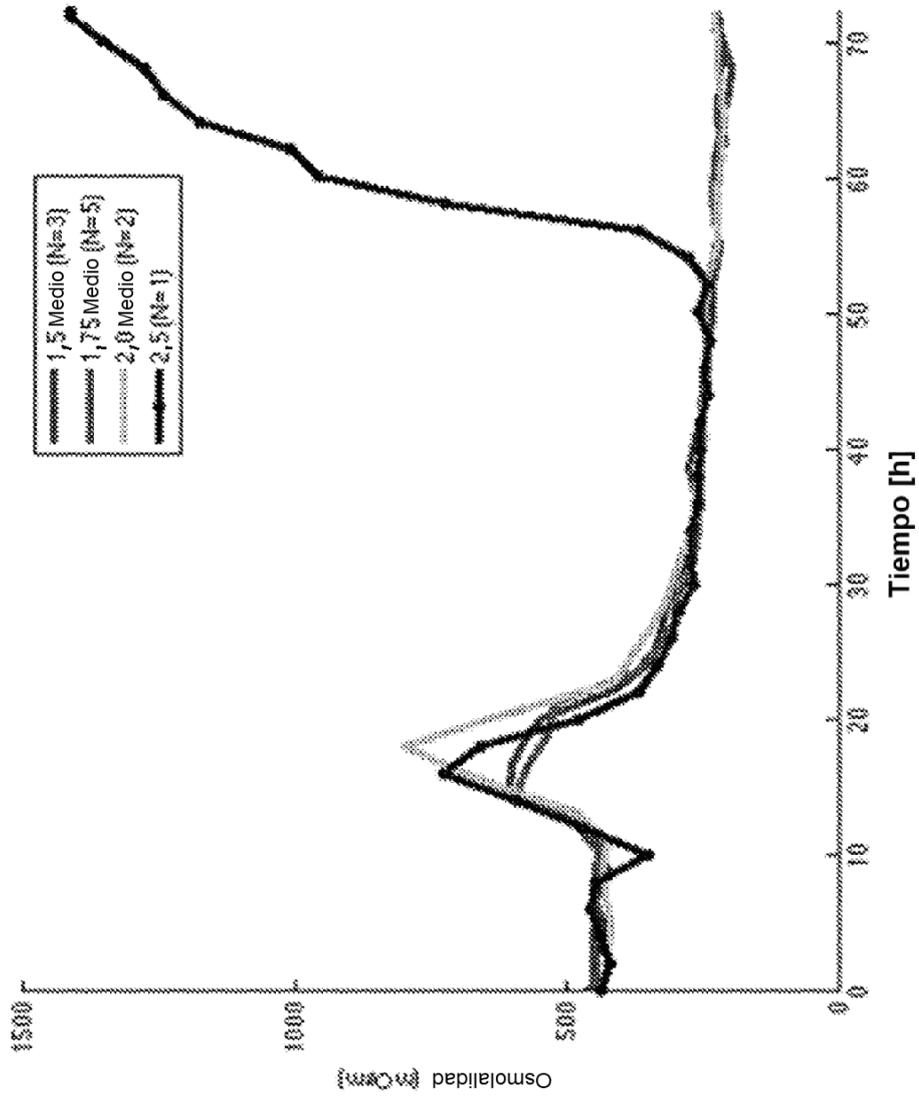


FIG. 22

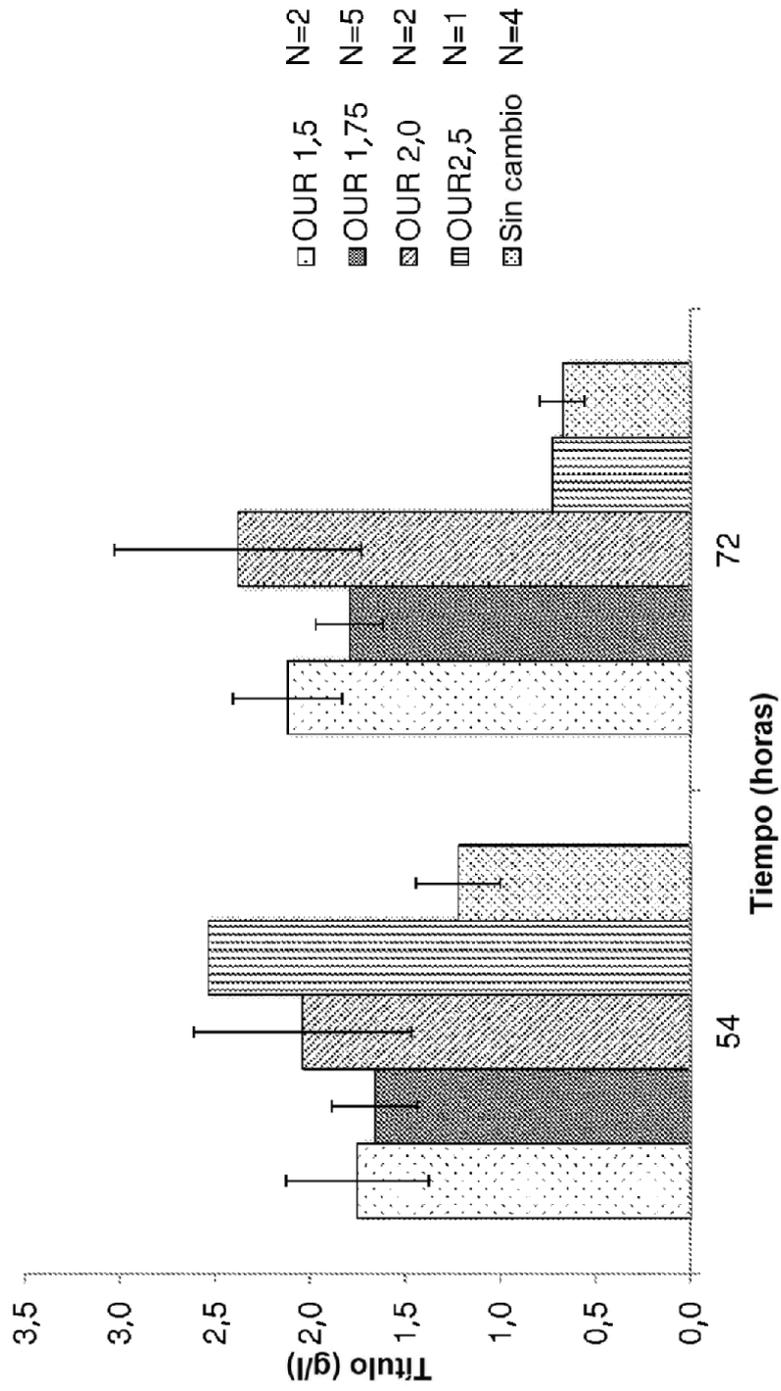


FIG. 23

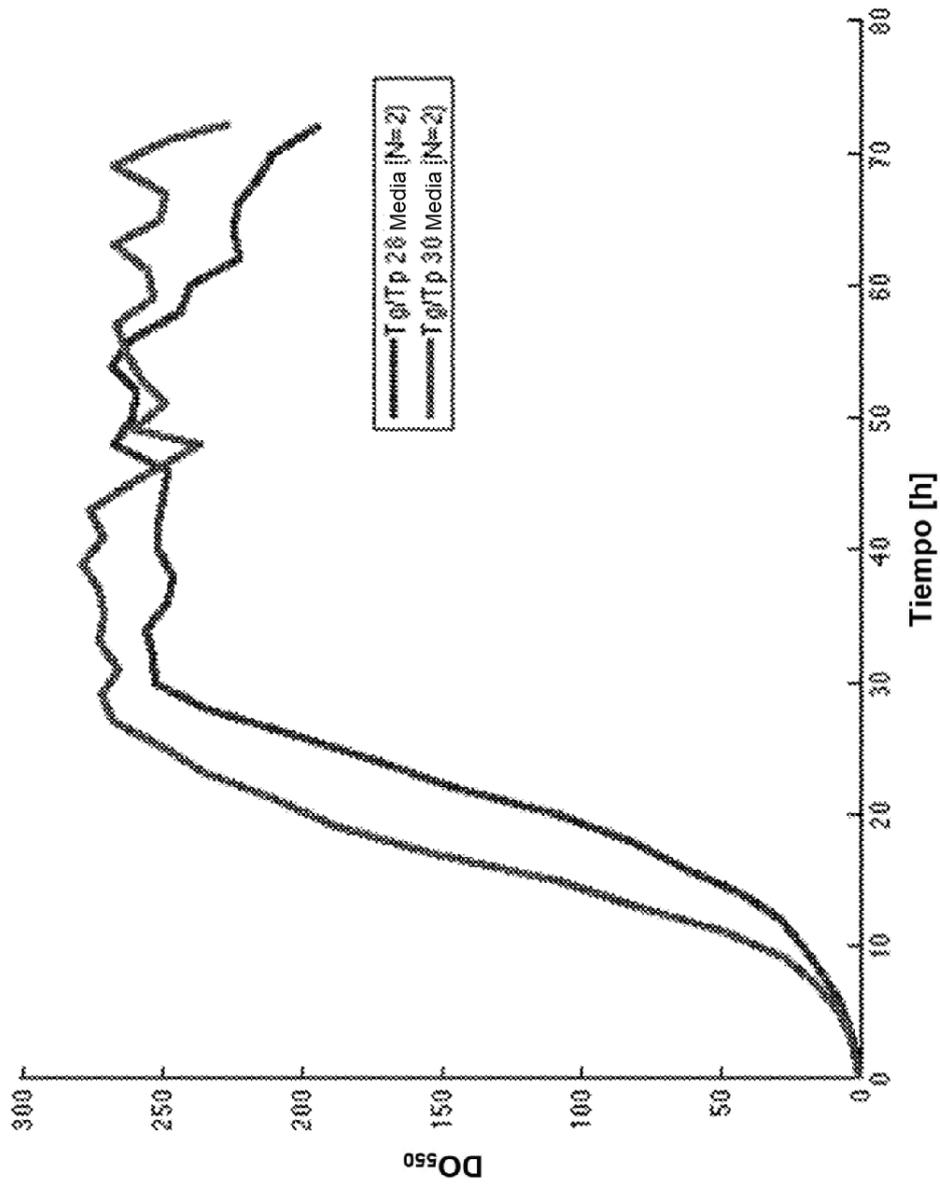


FIG. 24

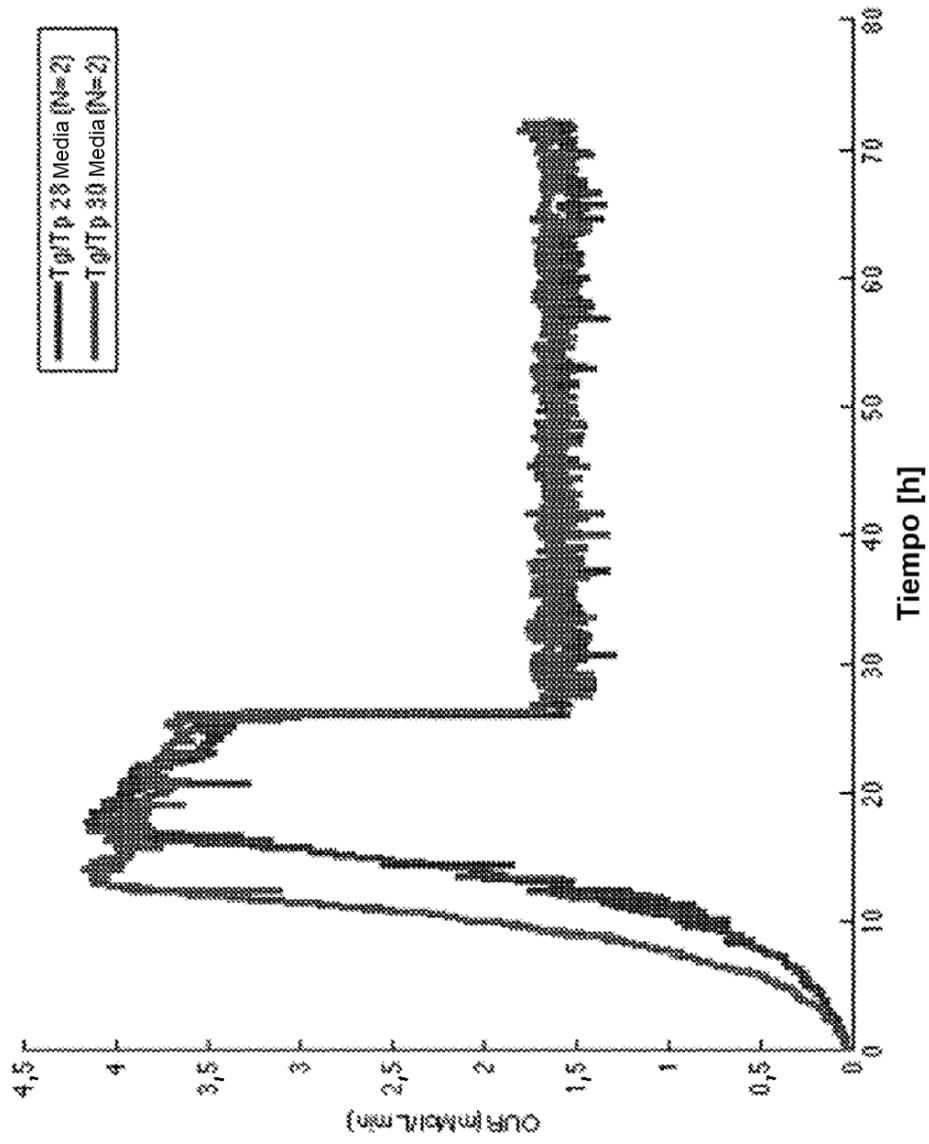


FIG. 25

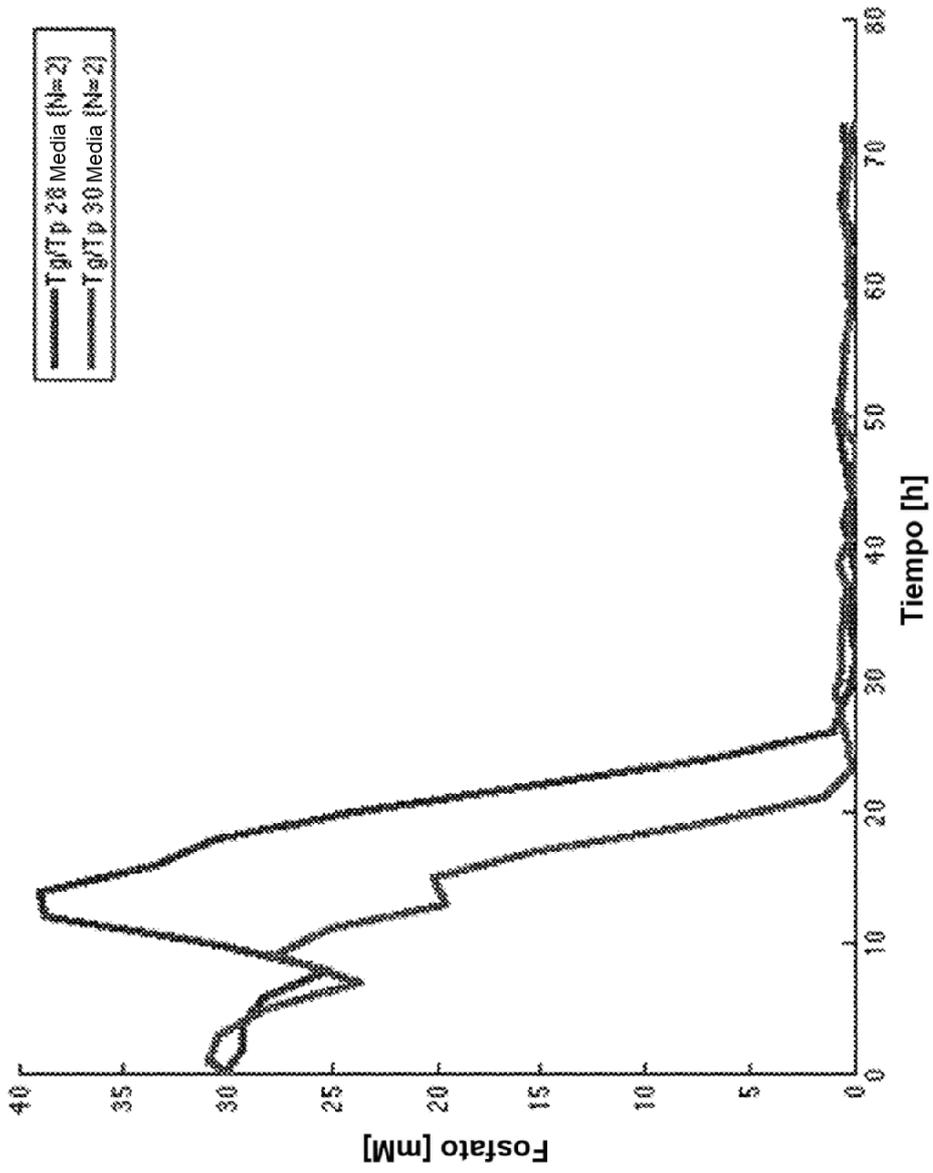


FIG. 26

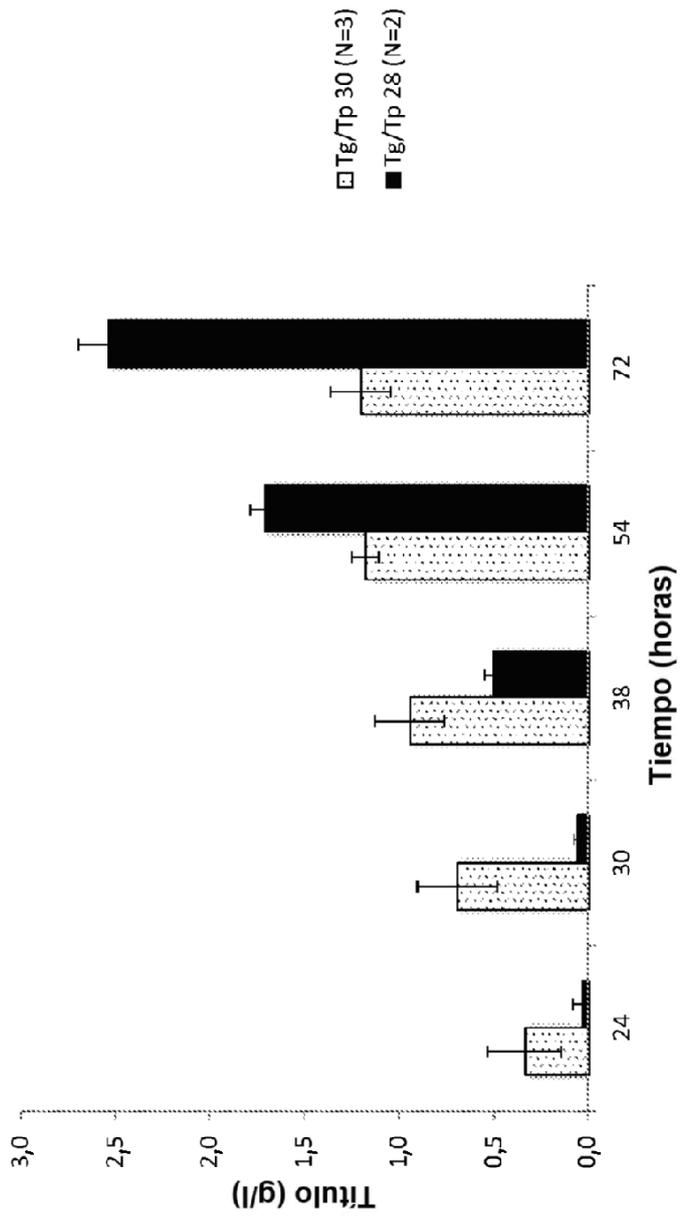


FIG. 27

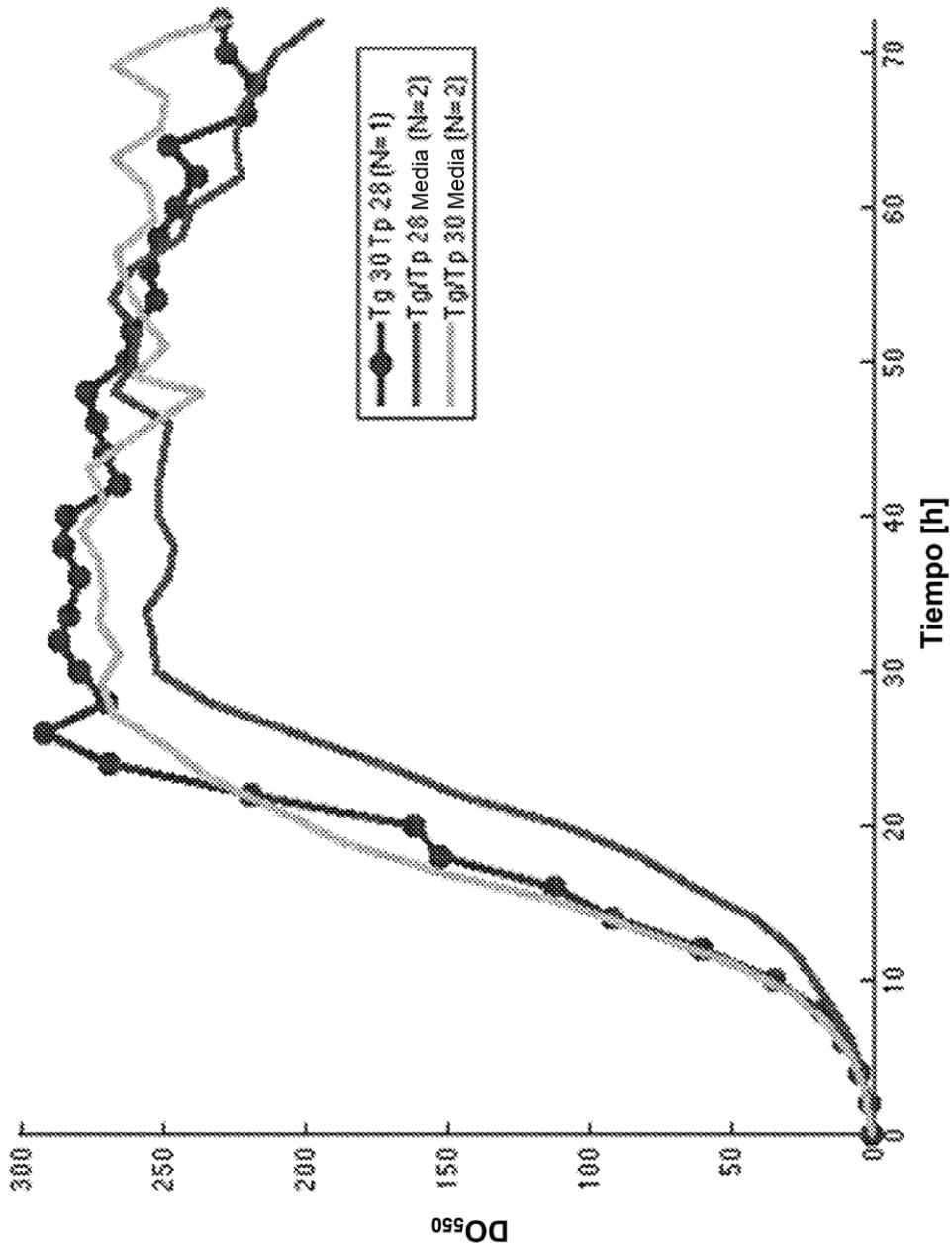


FIG. 28

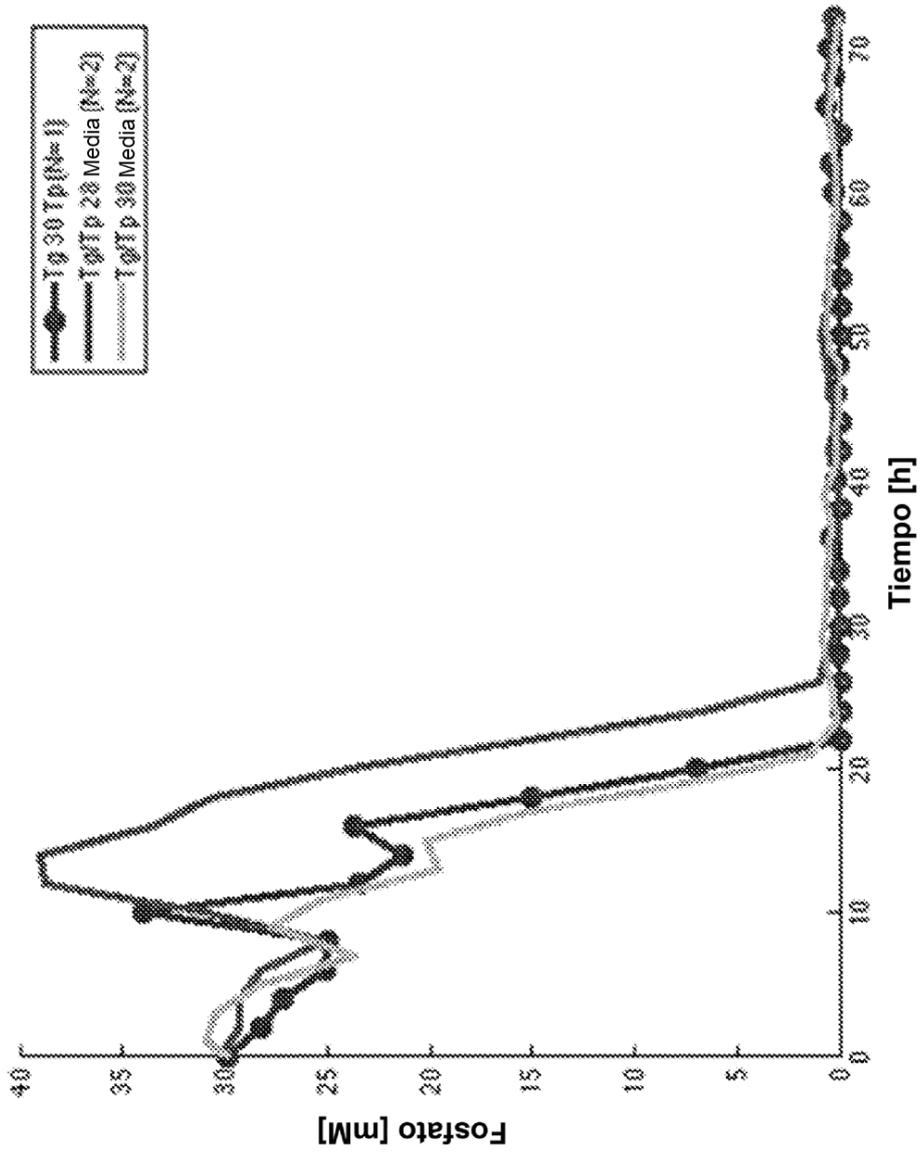


FIG. 29

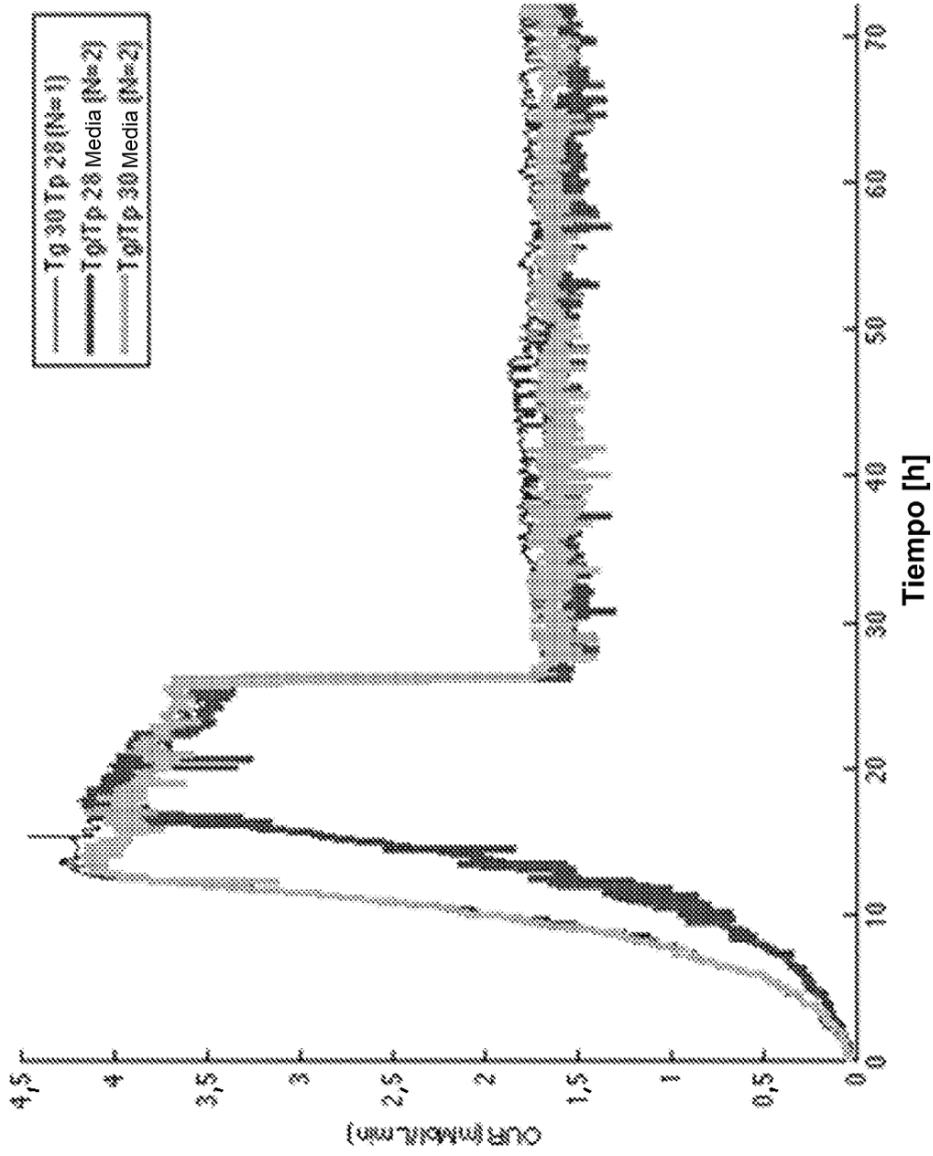


FIG. 30

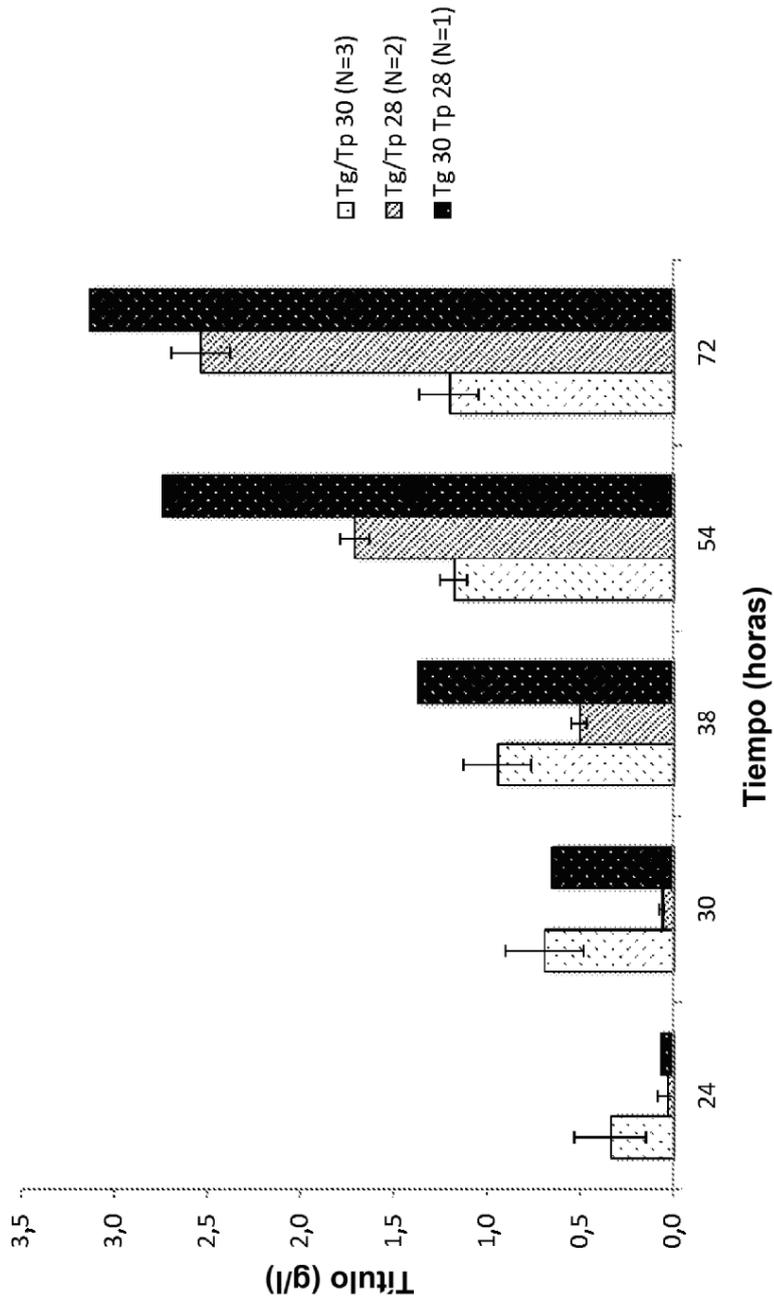
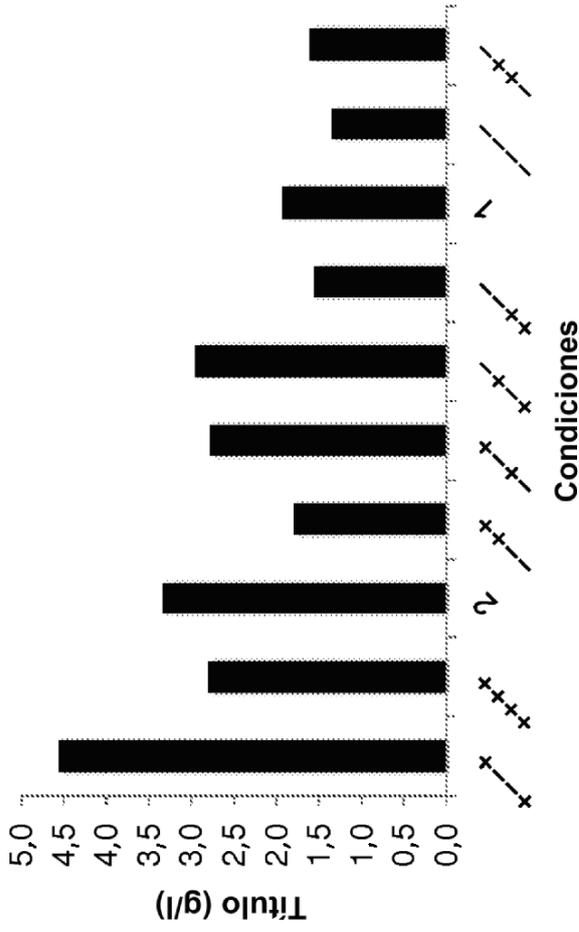


FIG. 31



Patrón	Tg	Tp	pH	FkpA
-++	30	28	6,7	pho
0001	32	26,5	6,85	pho
----	30	25	6,7	tac
+--	34	25	7	tac
+++	34	25	6,7	pho
---	30	25	7	pho
--	30	28	7	tac
++++	34	28	7	pho
+++	34	28	6,7	tac
0002	32	26,5	6,85	pho

FIG. 32

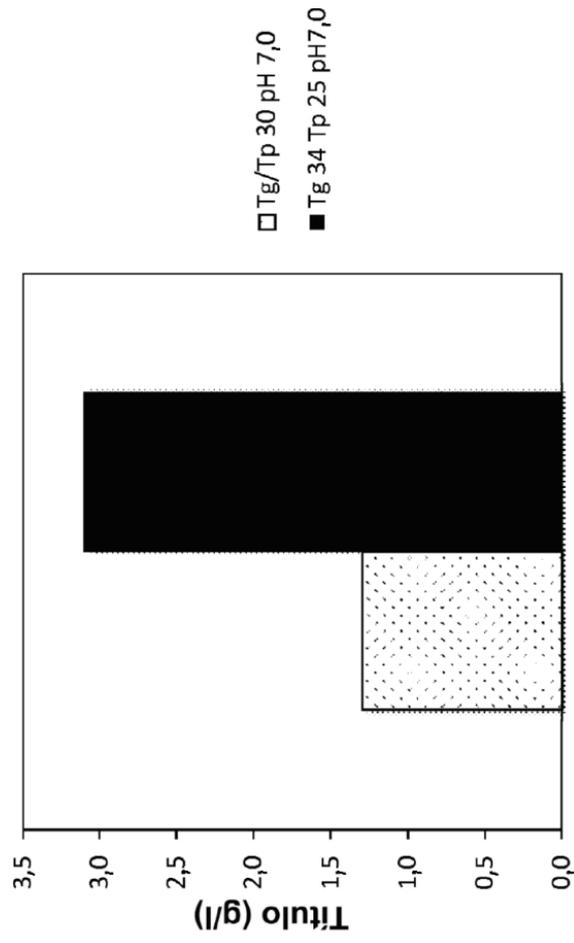
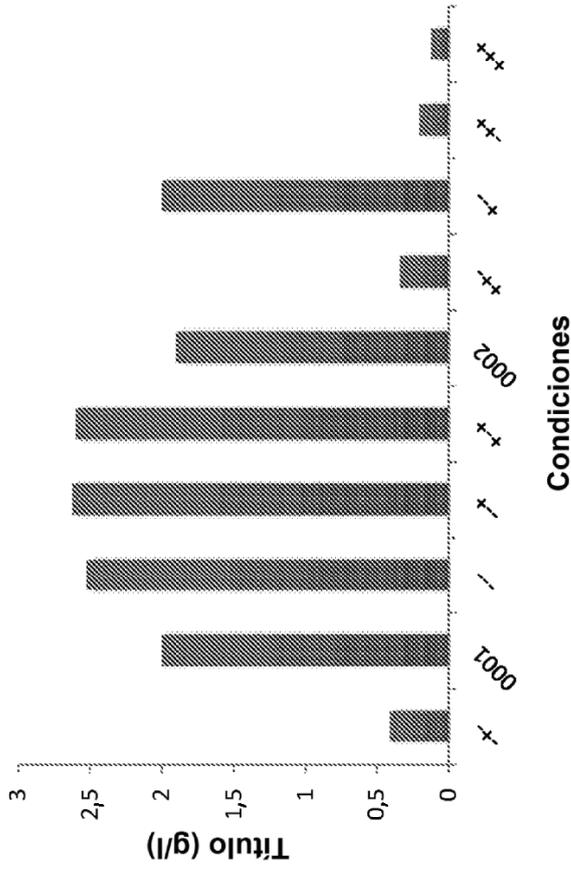


FIG. 33



Patrón	Tg	Tp	pH
--	30	30	6,7
000	32	27,5	7,0
---	30	25	6,7
---+	30	25	7,3
+++	34	25	7,3
000	32	27,5	7,0
++-	34	30	6,7.
+---	34	25	6,7
--+	30	30	7,3
+++	34	30	7,3

FIG. 34

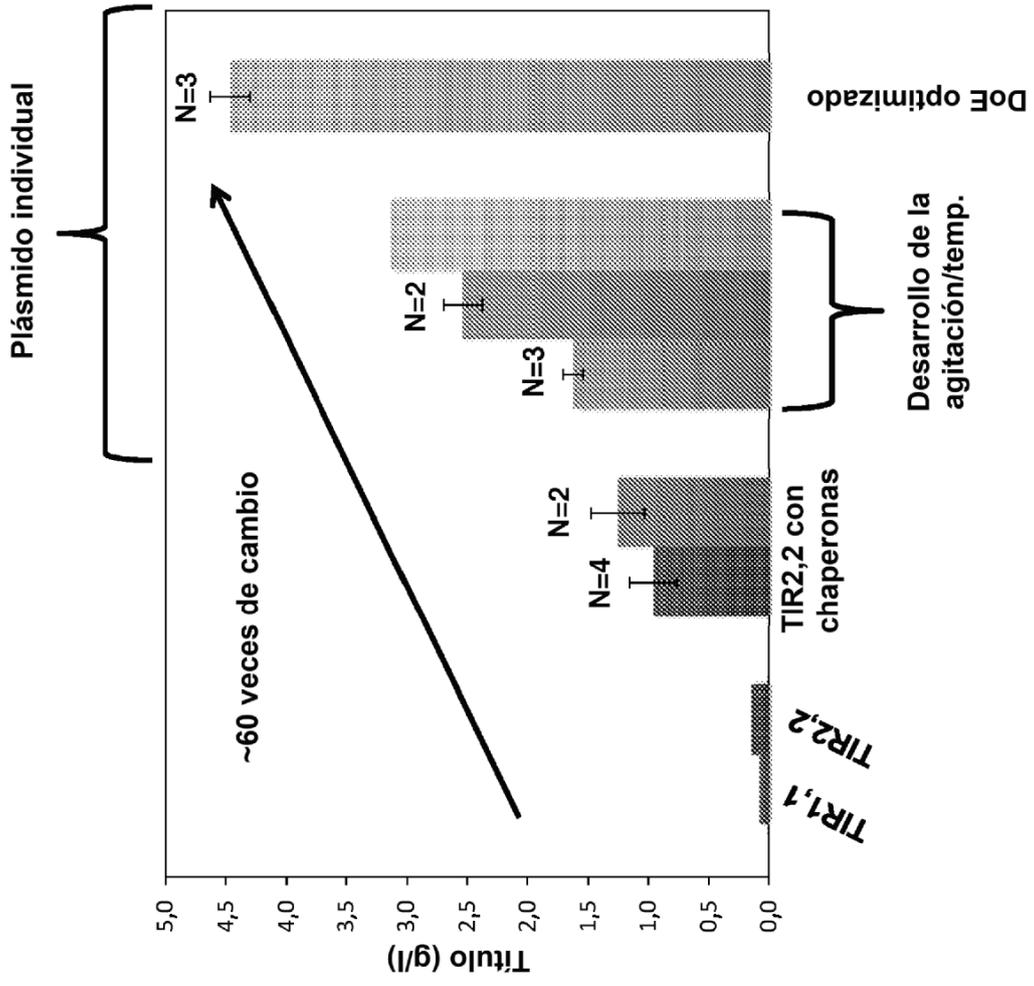


FIG. 35

FIG. 36A

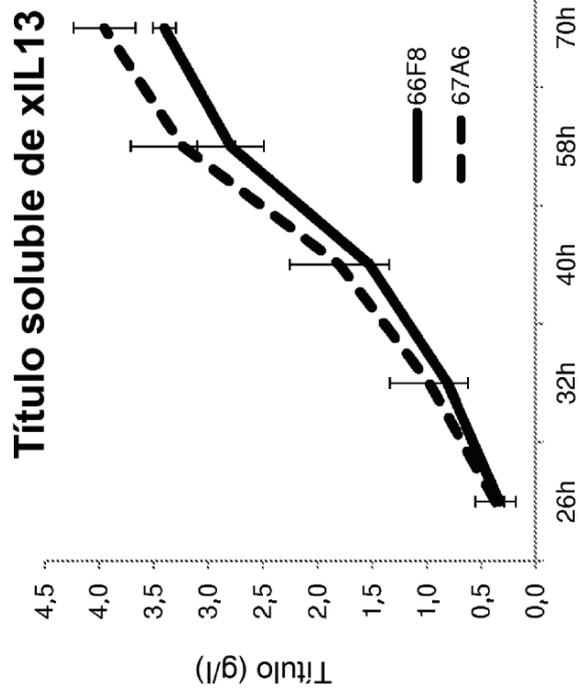
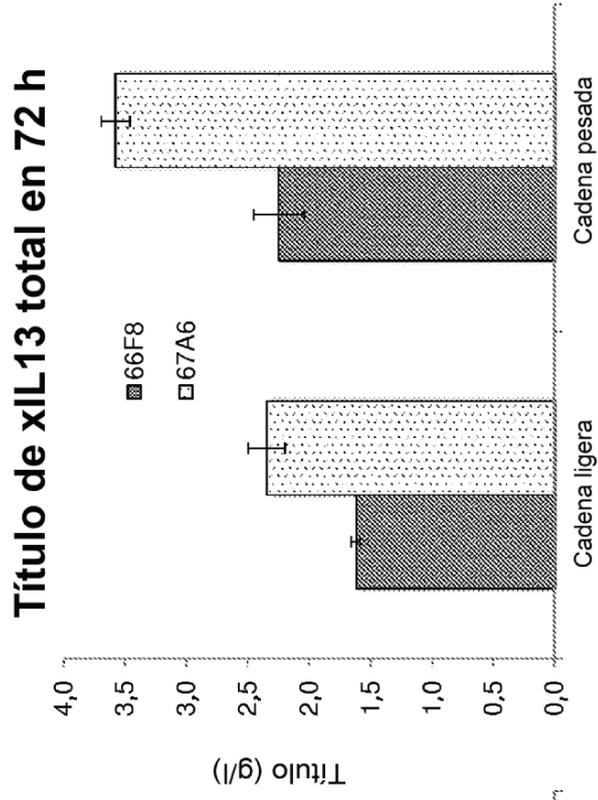


FIG. 36B



66F8 = ΔDegP
67A6 = +DegPS210A

FIG. 37A

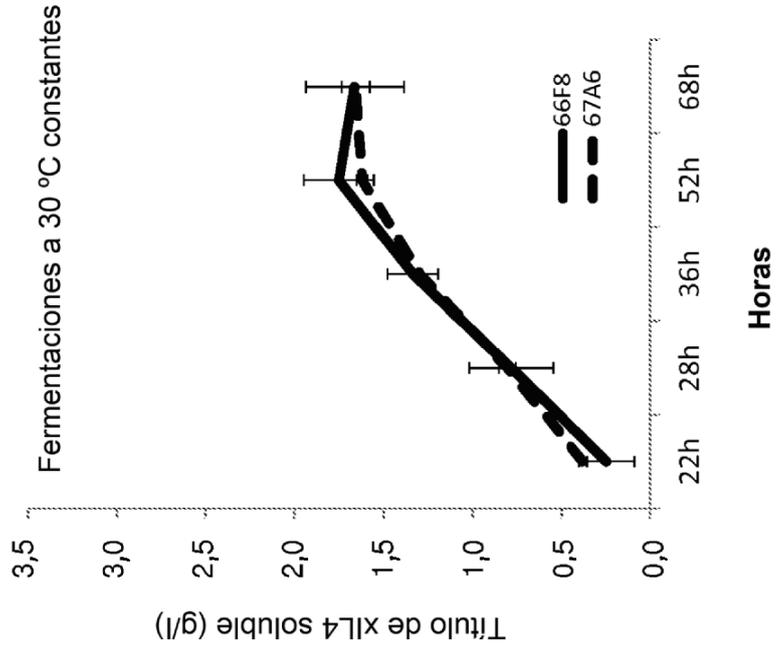


FIG. 37B

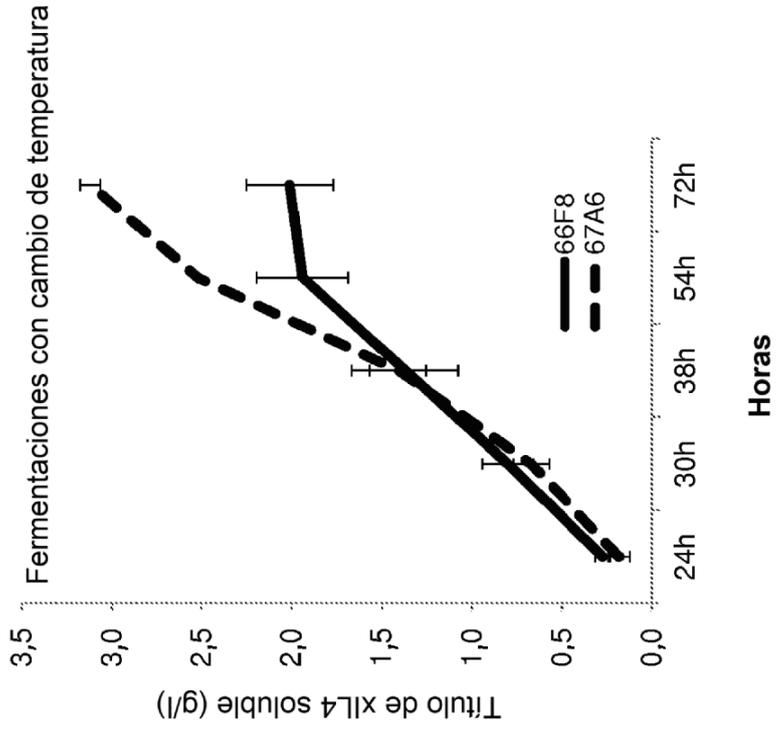


FIG. 38A

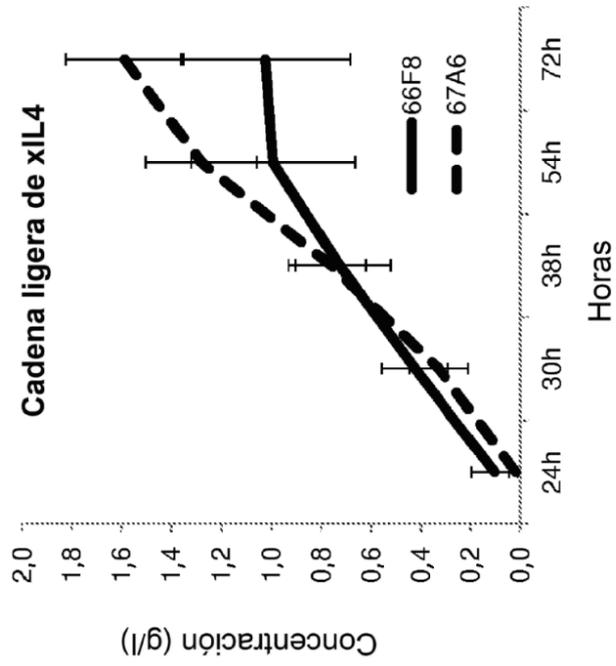
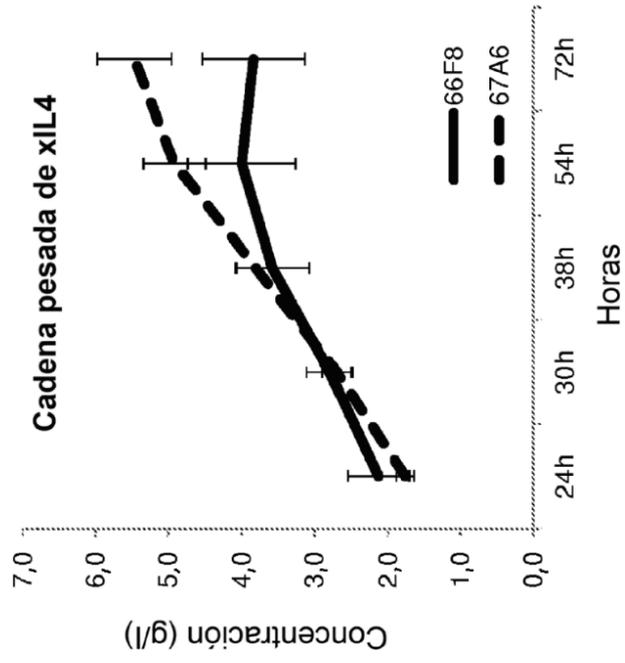
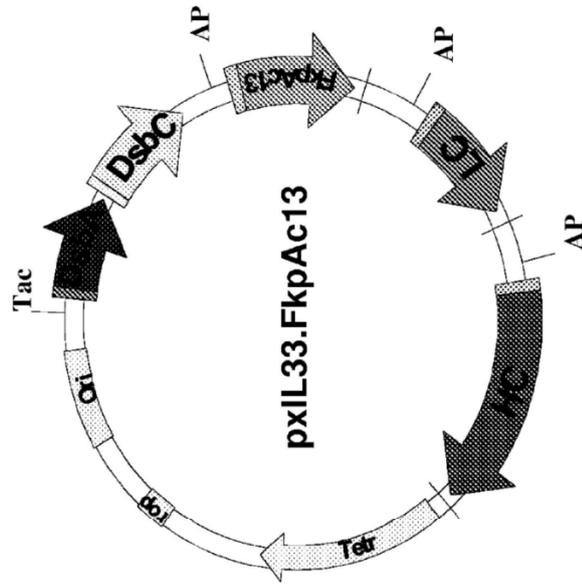


FIG. 38B





Plásmido individual

FIG. 39

Fermentaciones realizadas a 30 °C, 650 rpm y pH 7,0

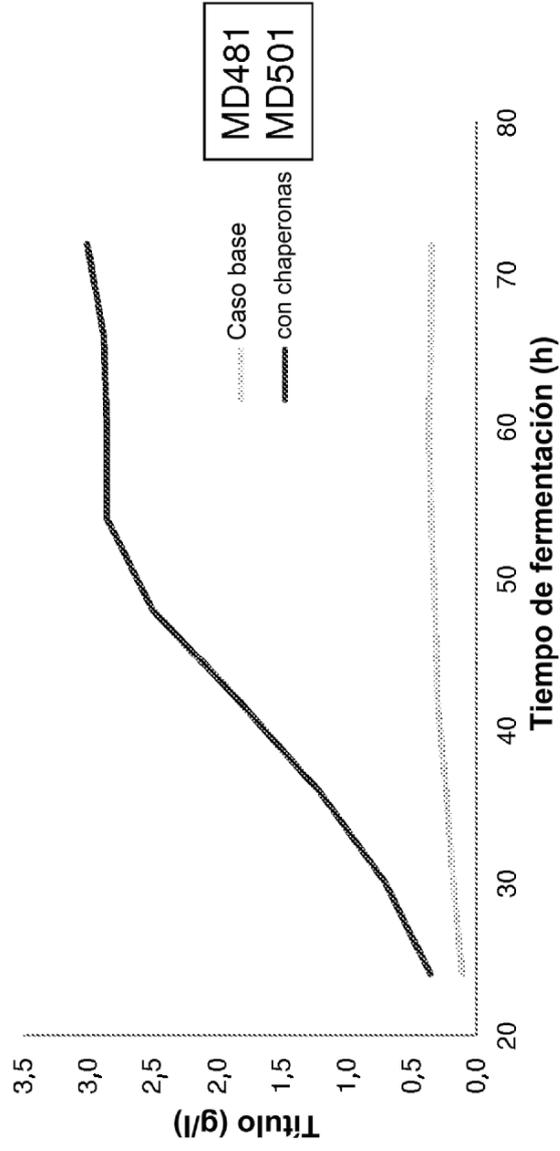


FIG. 40

Secuencia de variantes de péptido señal de FkpA

GAATTATGAA GTCGCTGTTT AAAGTTACGC TGCTGGCGAC CACAAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT
 CTTAACTACTT CAGCGACAAA TTTCAATGCG ACGACCGCTG GTGTTACCGG CAACGGGACG TACGTGGTTA GTGAAAACCGA
 M K S L F K V T L L A T T M A V A L H A P I T F A

^FkpA

^FkpA SP (c13)

GAATTATGAA GTCGCTGTTT AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT
 CTTAACTACTT CAGCGACAAA TTTCACTGCG ACGACCGCTG GTGTTACCGG CAACGGGACG TACGTGGTTA GTGAAAACCGA
 M K S L F K V T L L A T T M A V A L H A P I T F A

^FkpA

^FkpA SP (TIR1)

GAATTATGAA GTCGCTATTG AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT
 CTTAACTACTT CAGCGATAAG TTTCACTGCG ACGACCGCTG GTGTTACCGG CAACGGGACG TACGTGGTTA GTGAAAACCGA
 M K S L F K V T L L A T T M A V A L H A P I T F A

^FkpA

^FkpA SP (TIR2)

FIG. 42

Resultados de la medición de TIR de
variantes de péptidos señal de FkpA

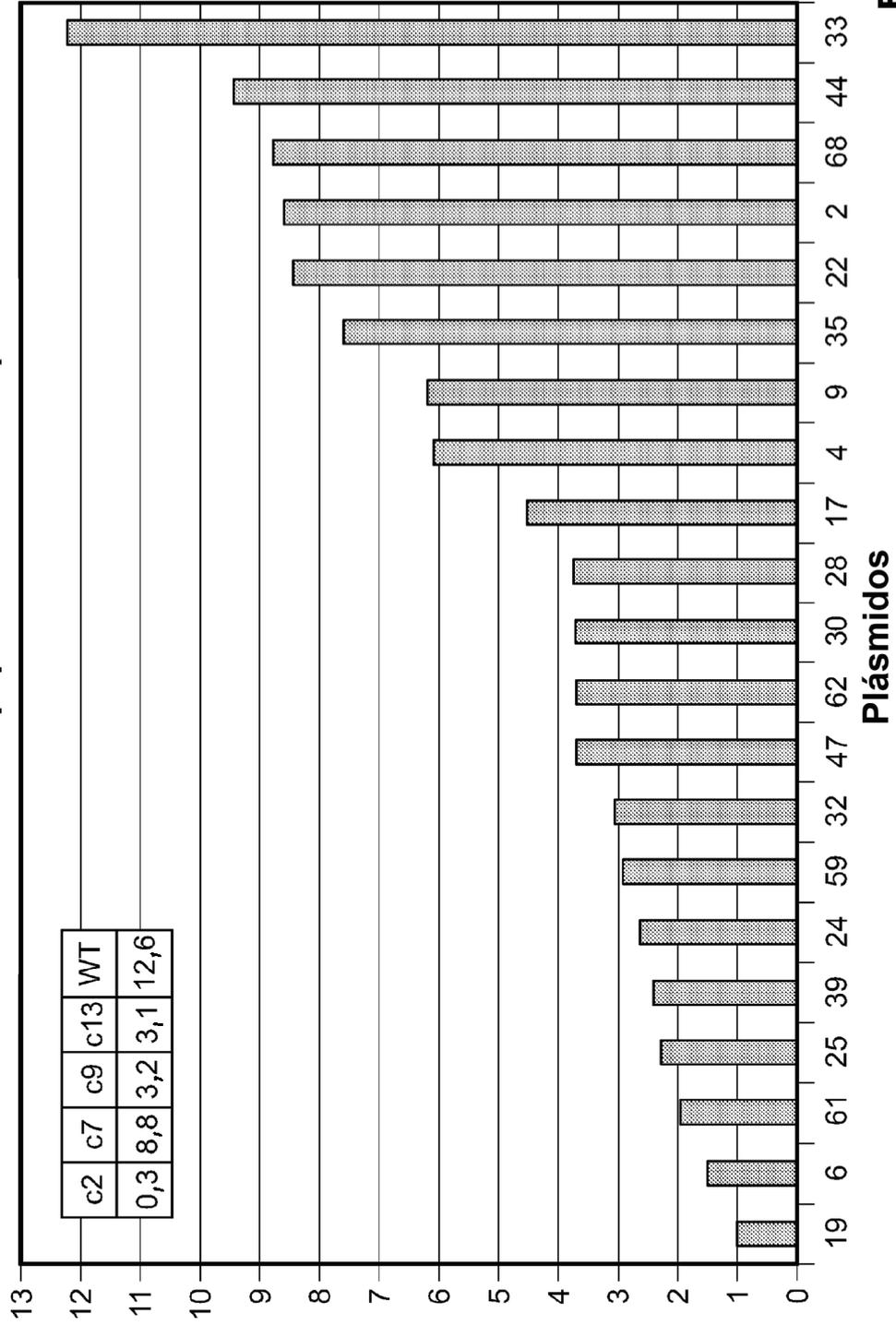


FIG. 43

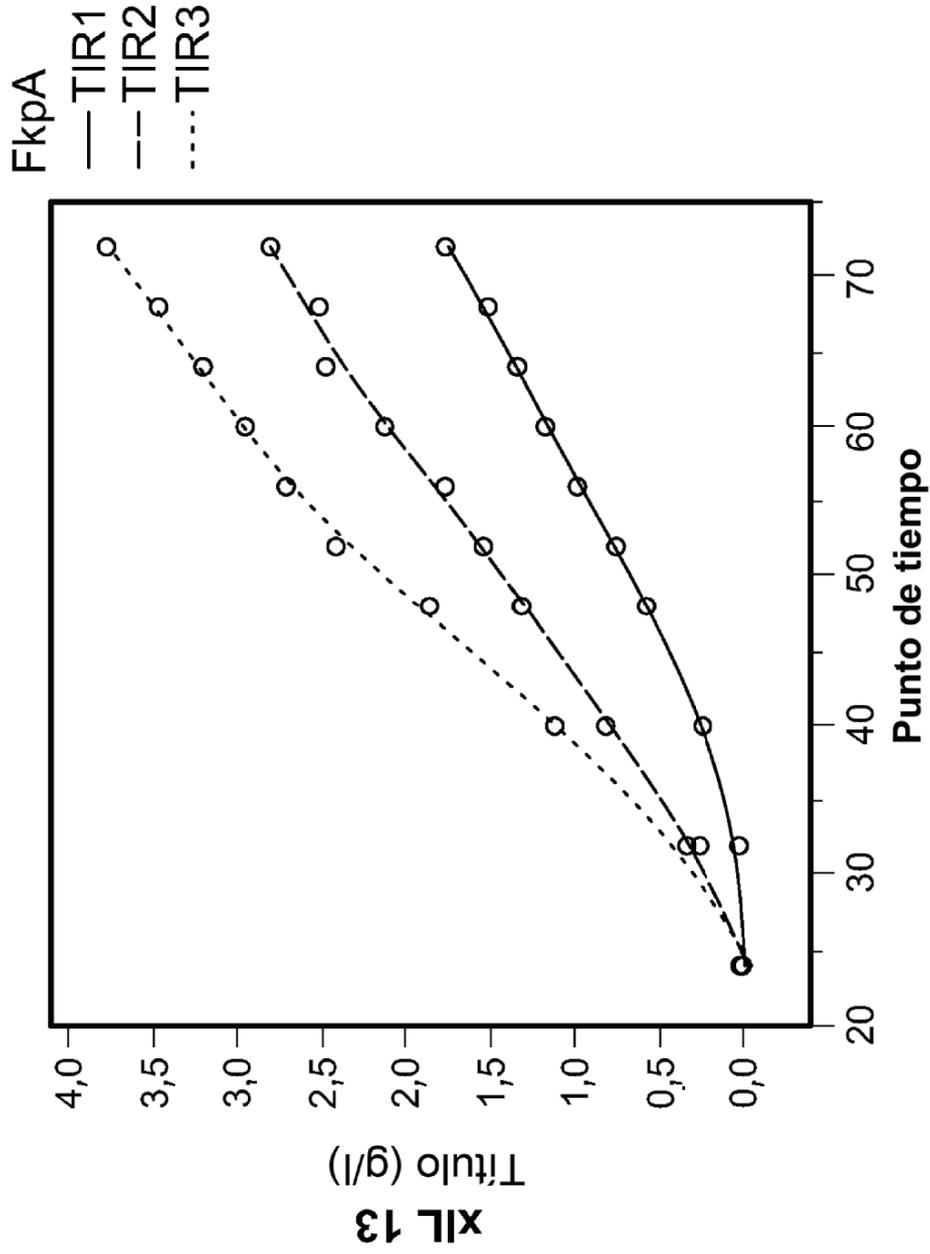


FIG. 44

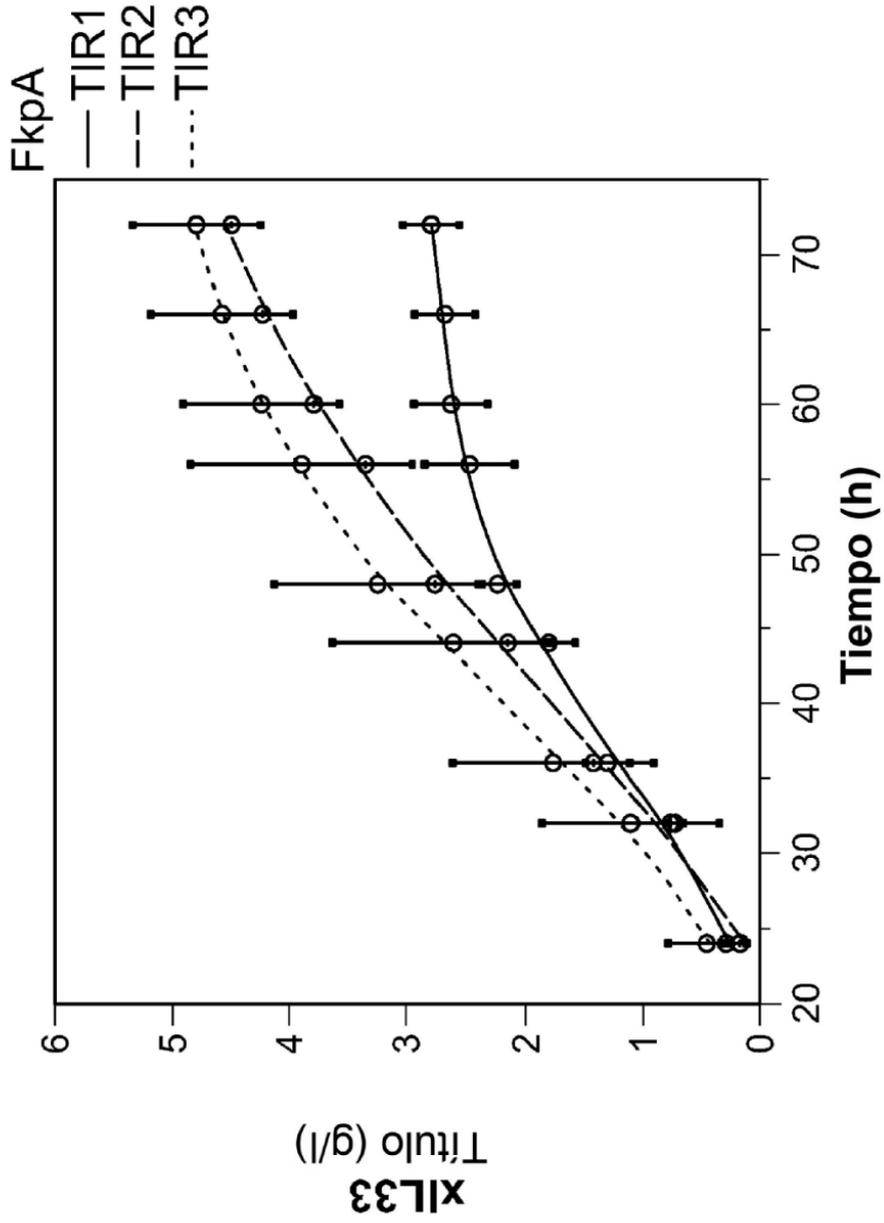


FIG. 45

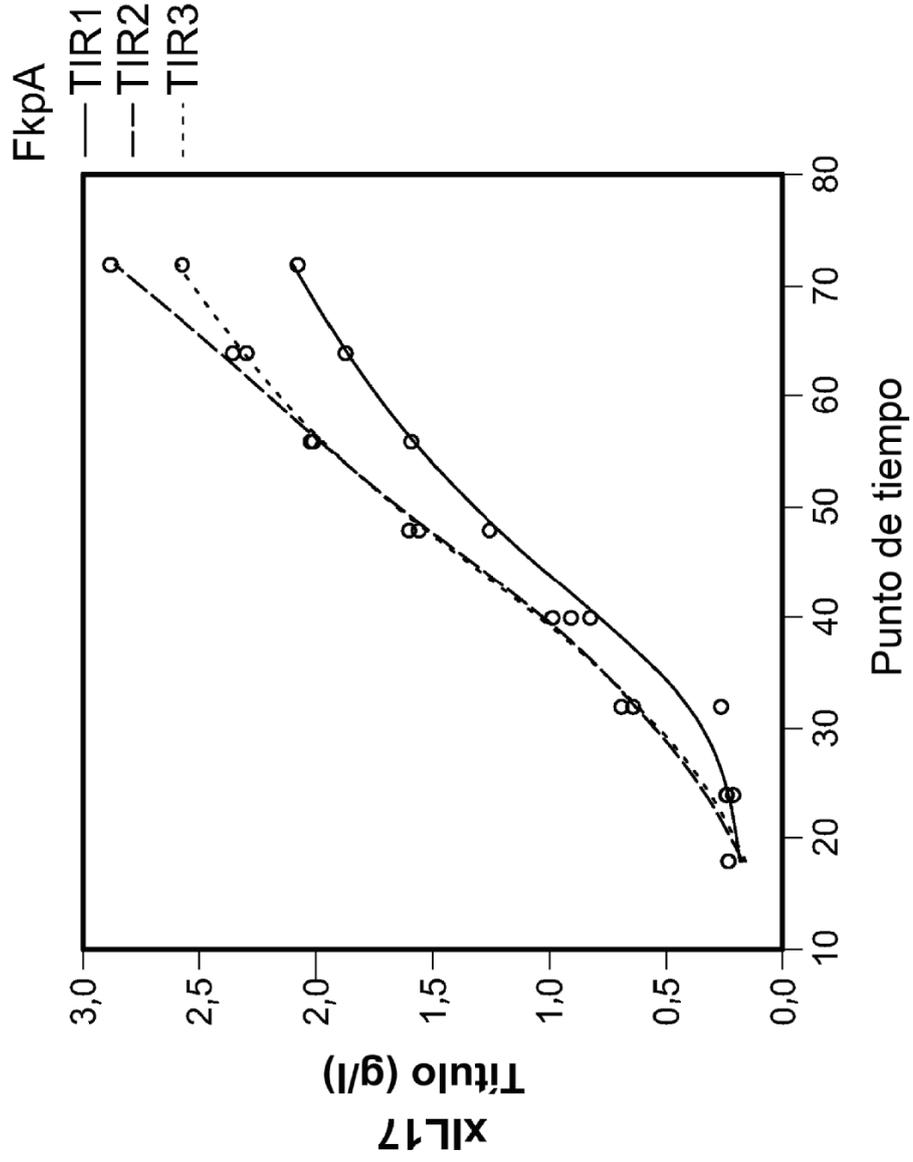


FIG. 46

FIG. 47A

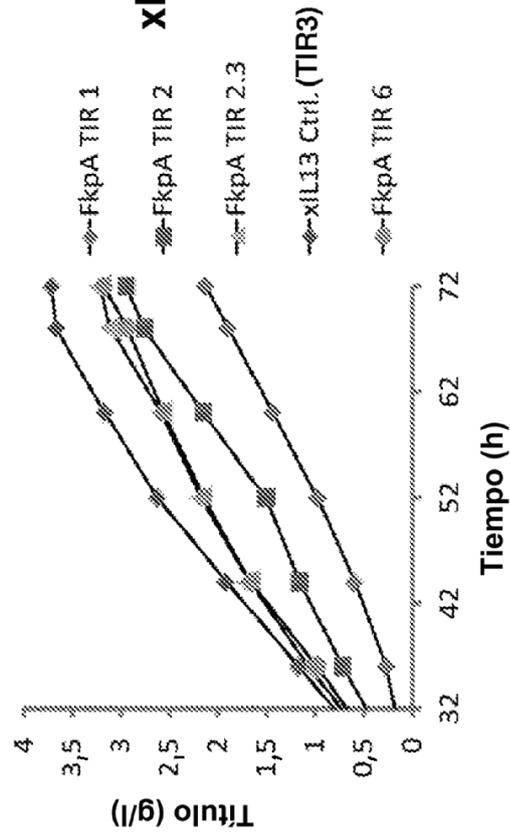


FIG. 47B

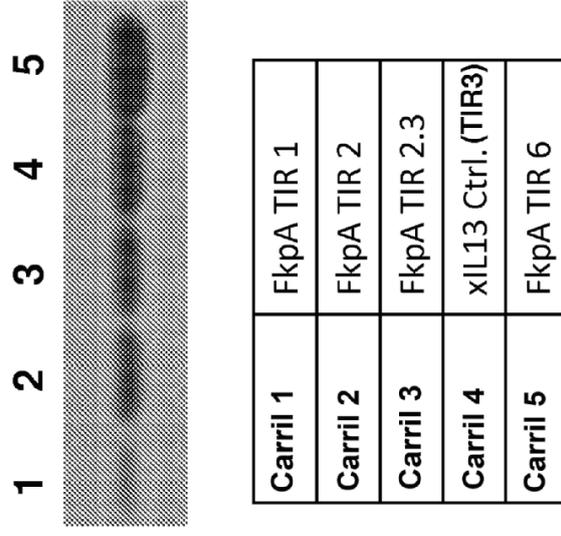


FIG. 48B

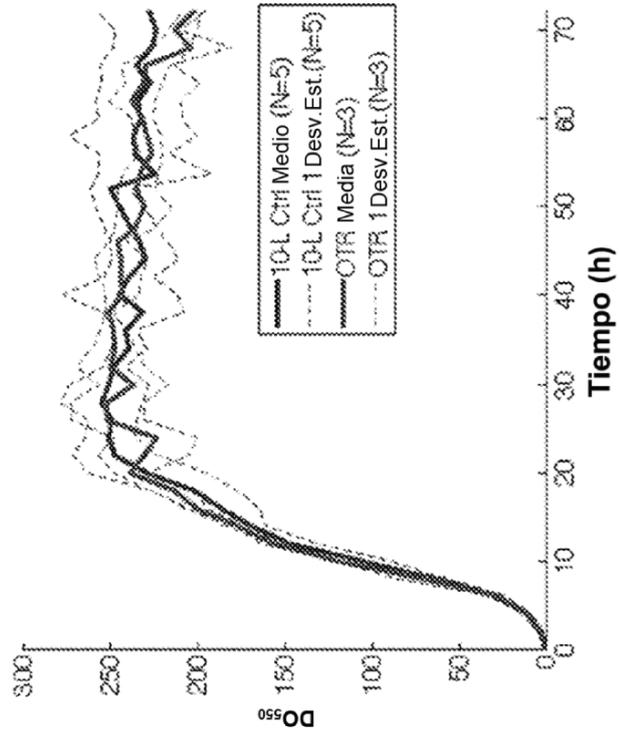
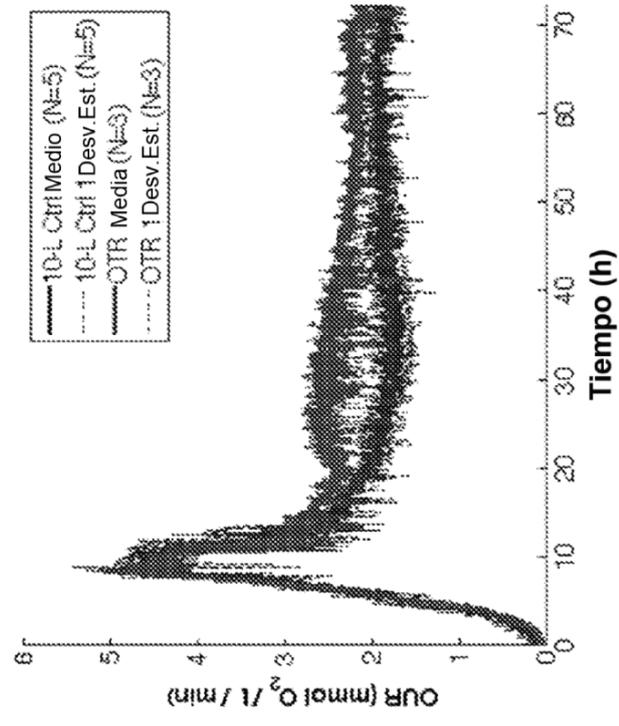


FIG. 48A



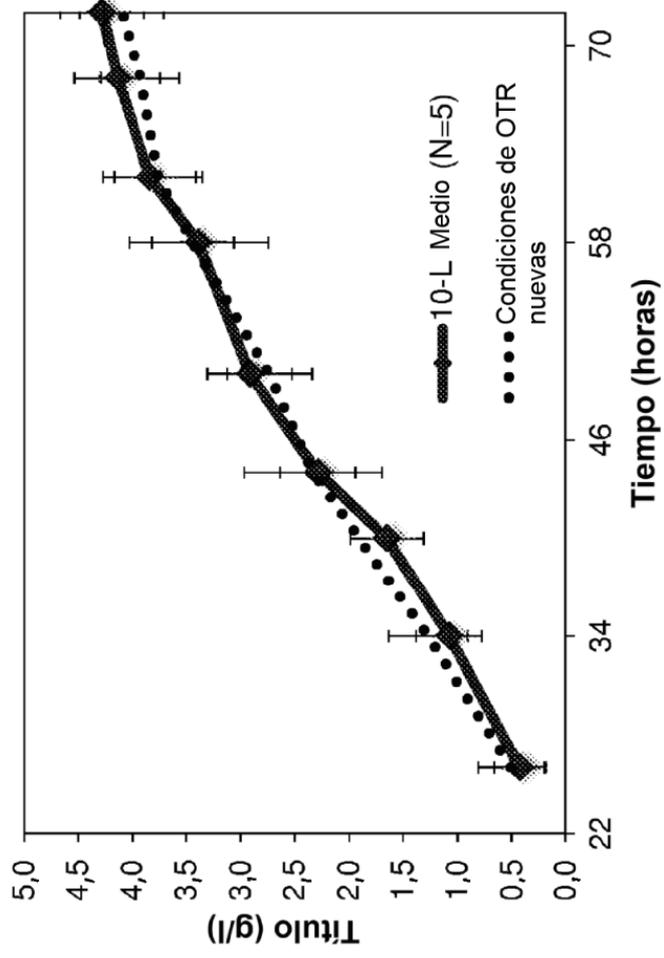


FIG. 49

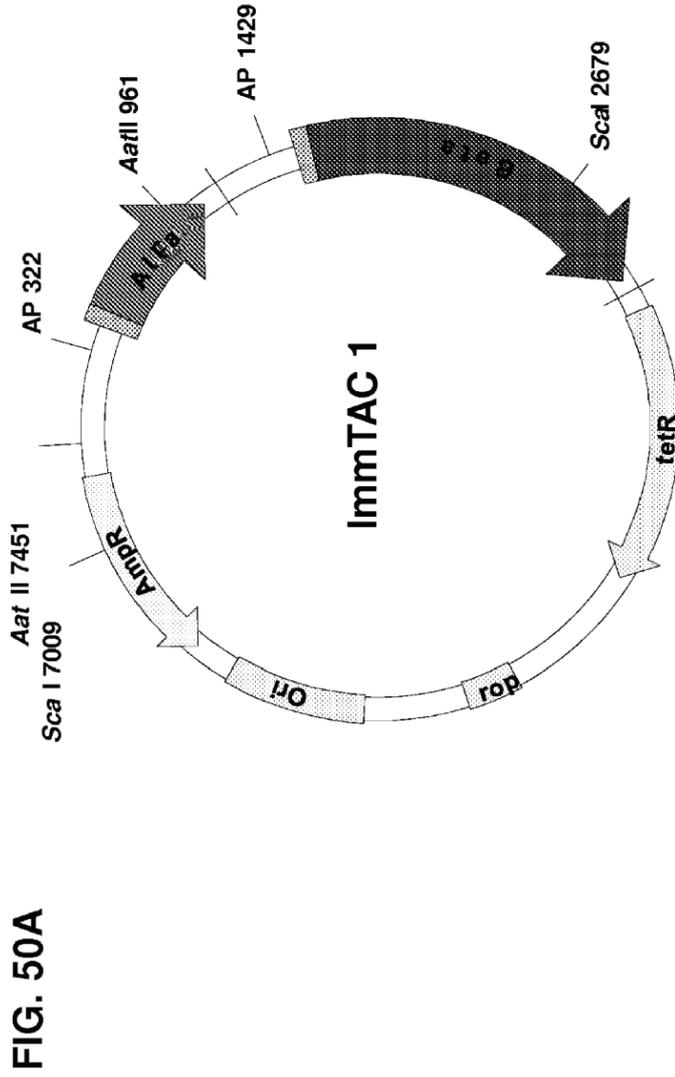


FIG. 50B

Pho / Pho (TIR = 1, 1)



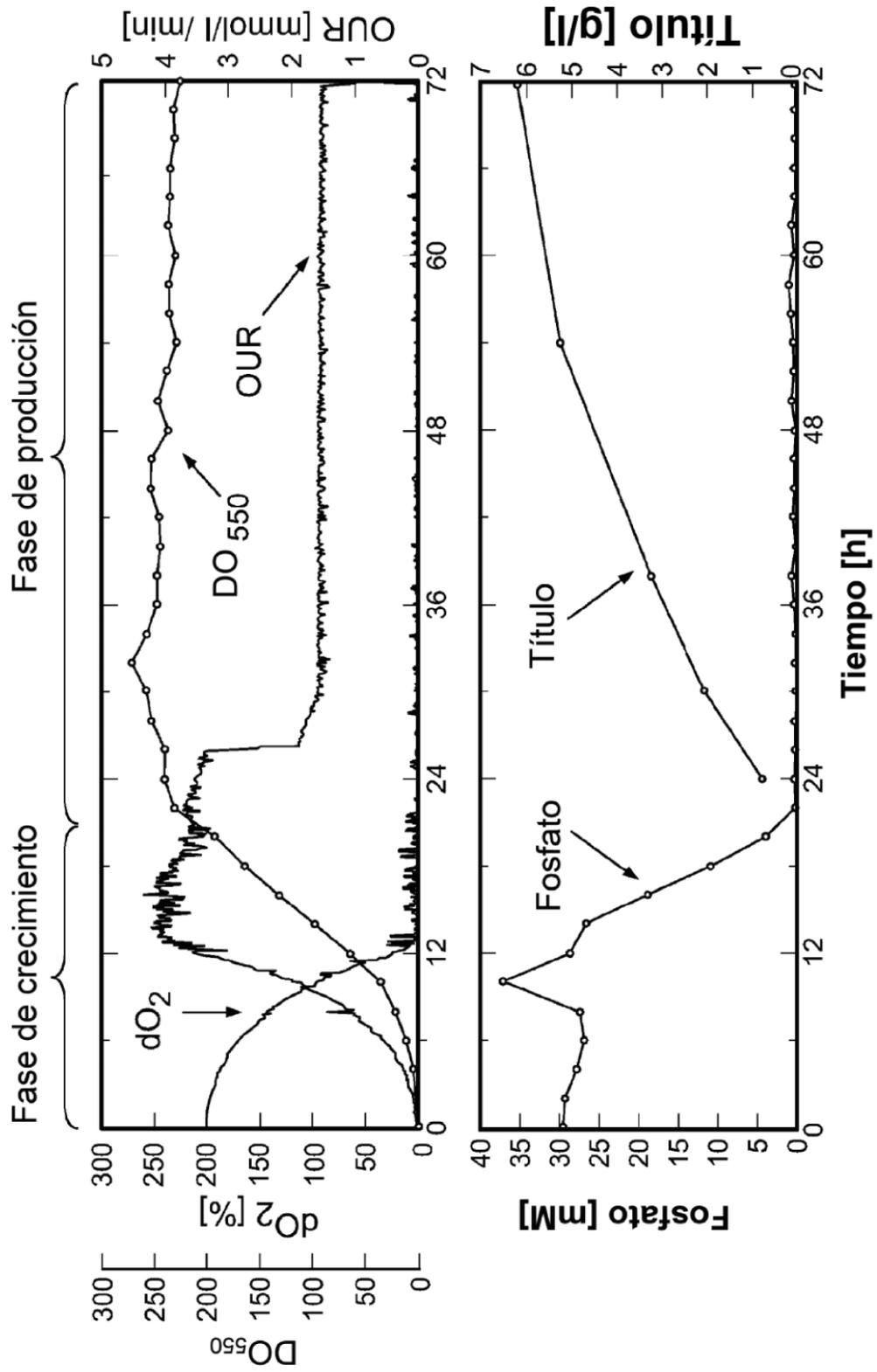


FIG. 51

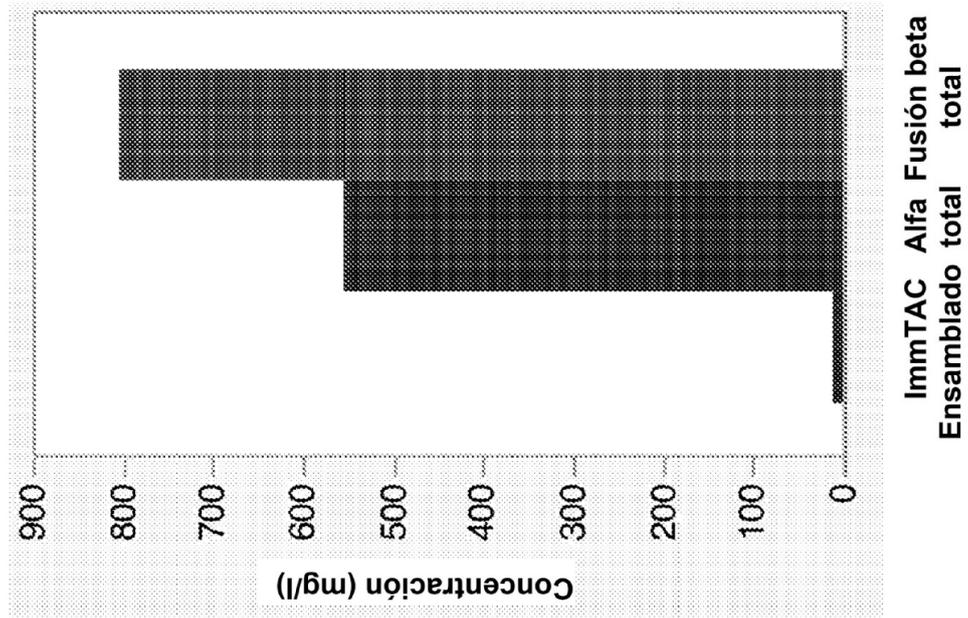


FIG. 52

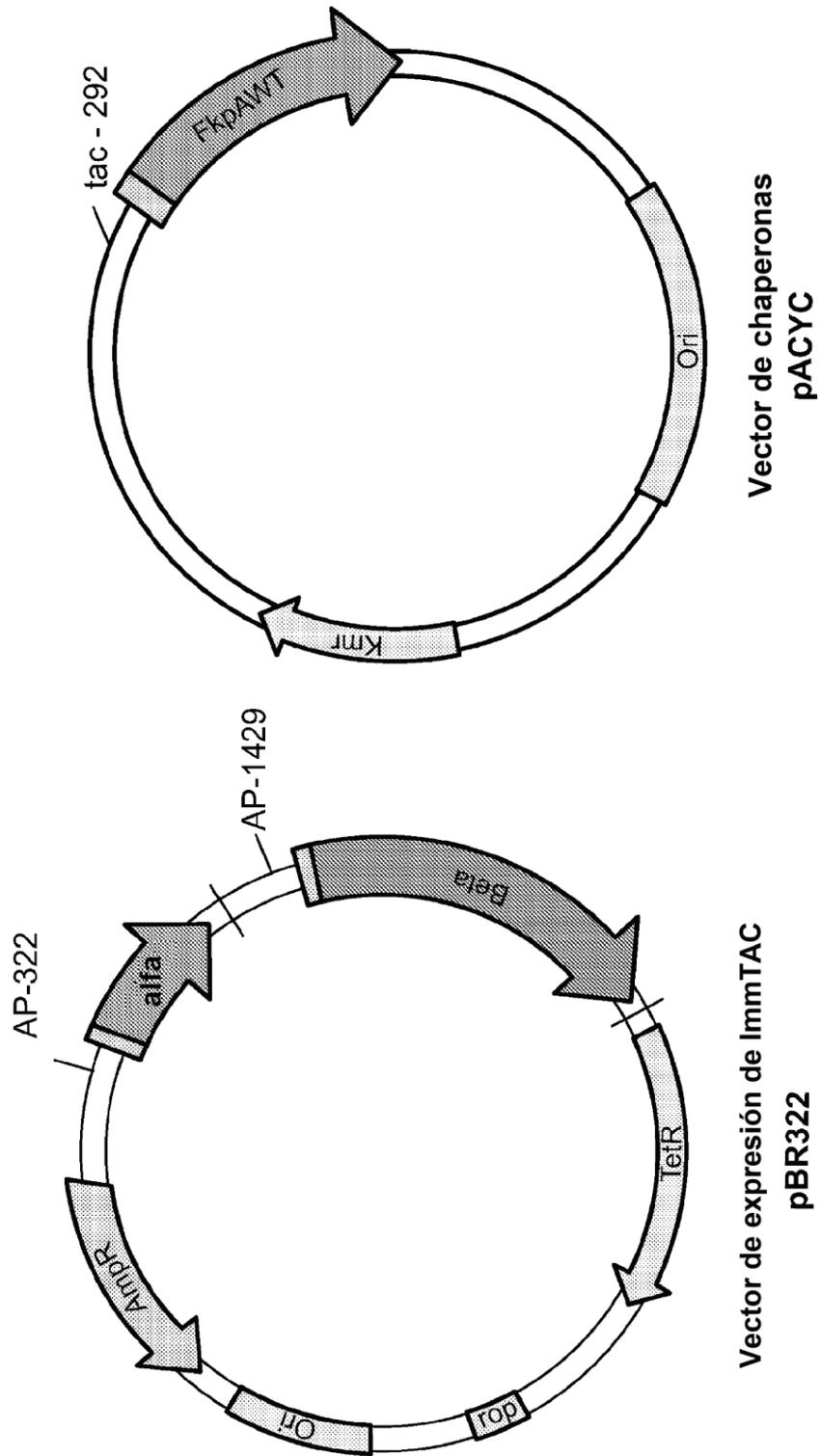


FIG. 53

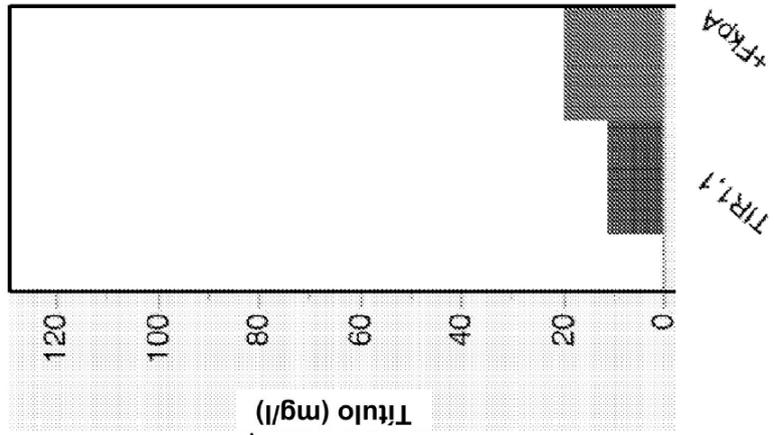


FIG. 54B

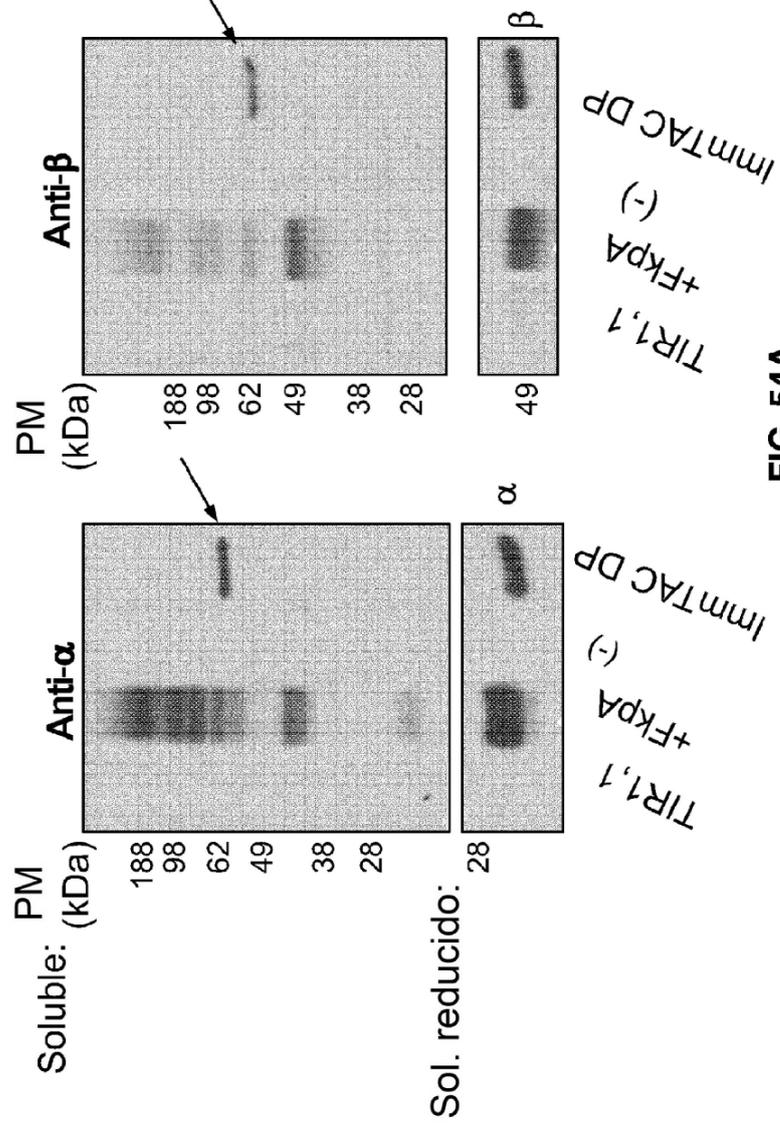


FIG. 54A

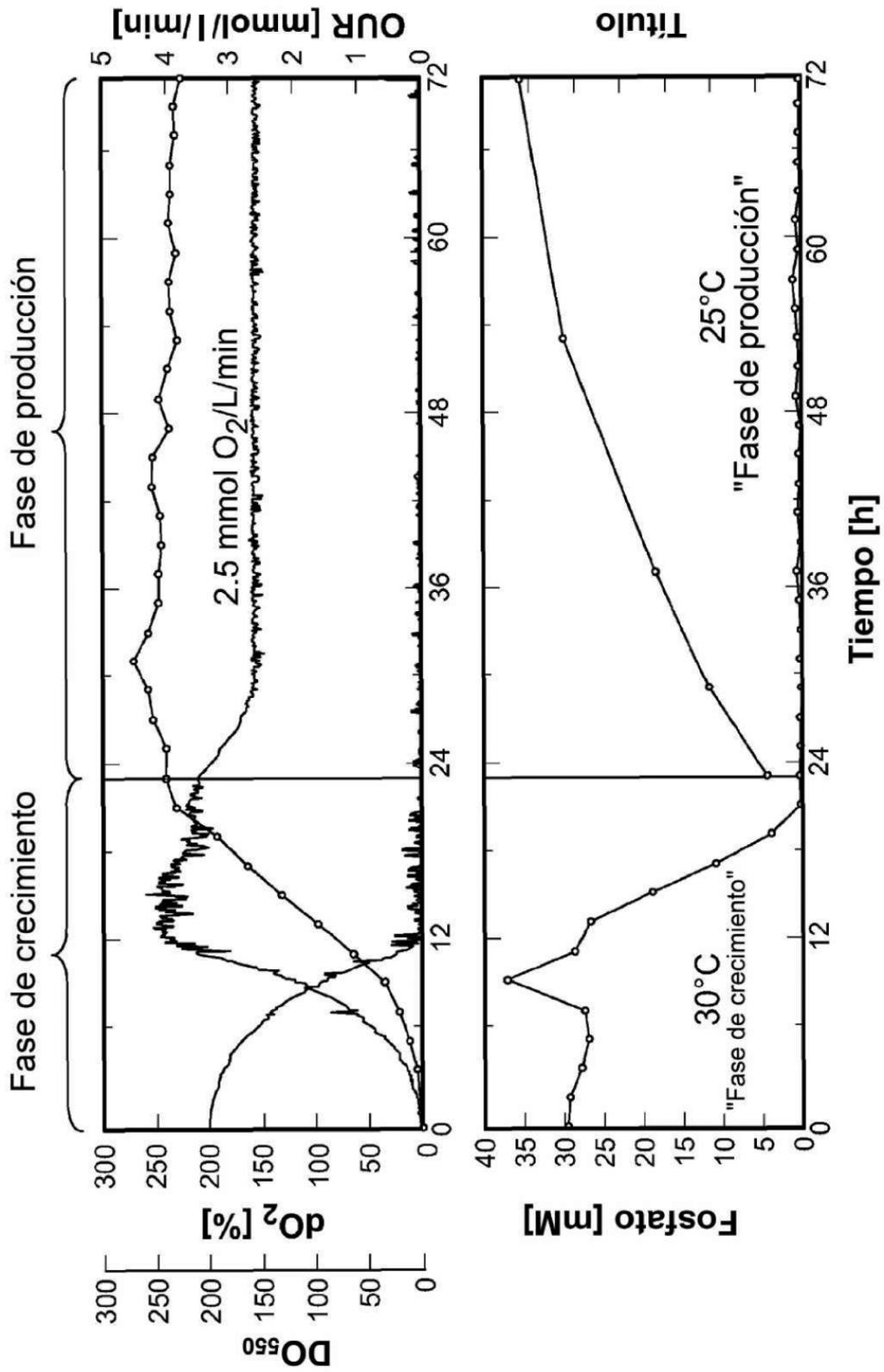


FIG. 55

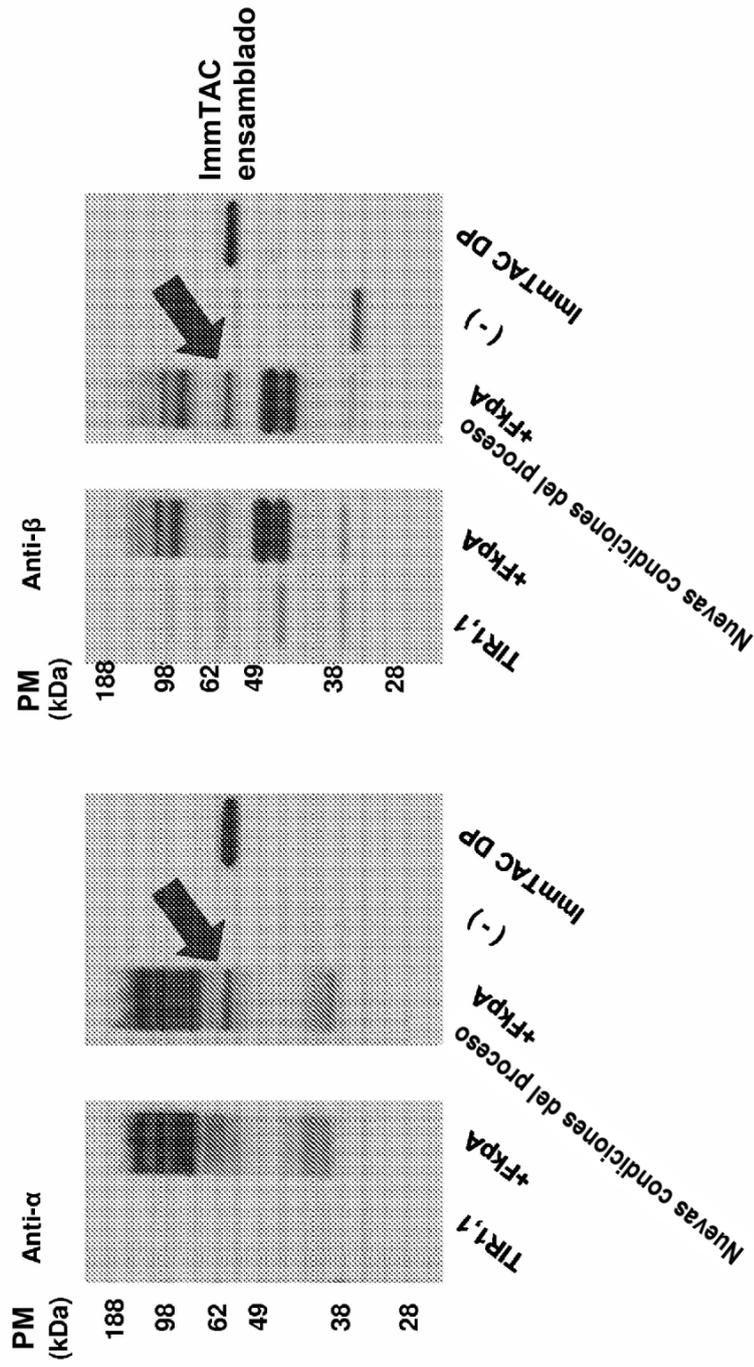


FIG. 56A

FIG. 56B

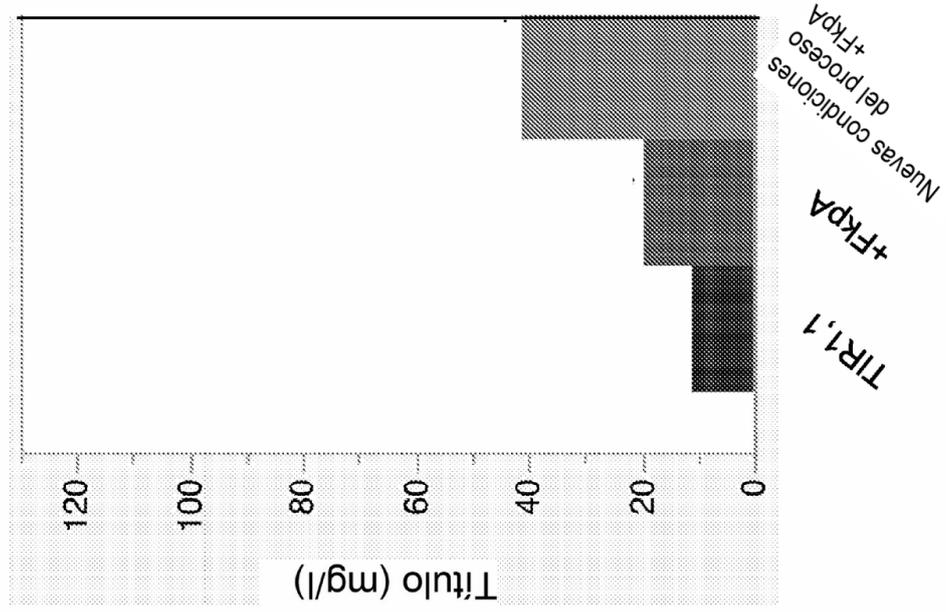


FIG. 57

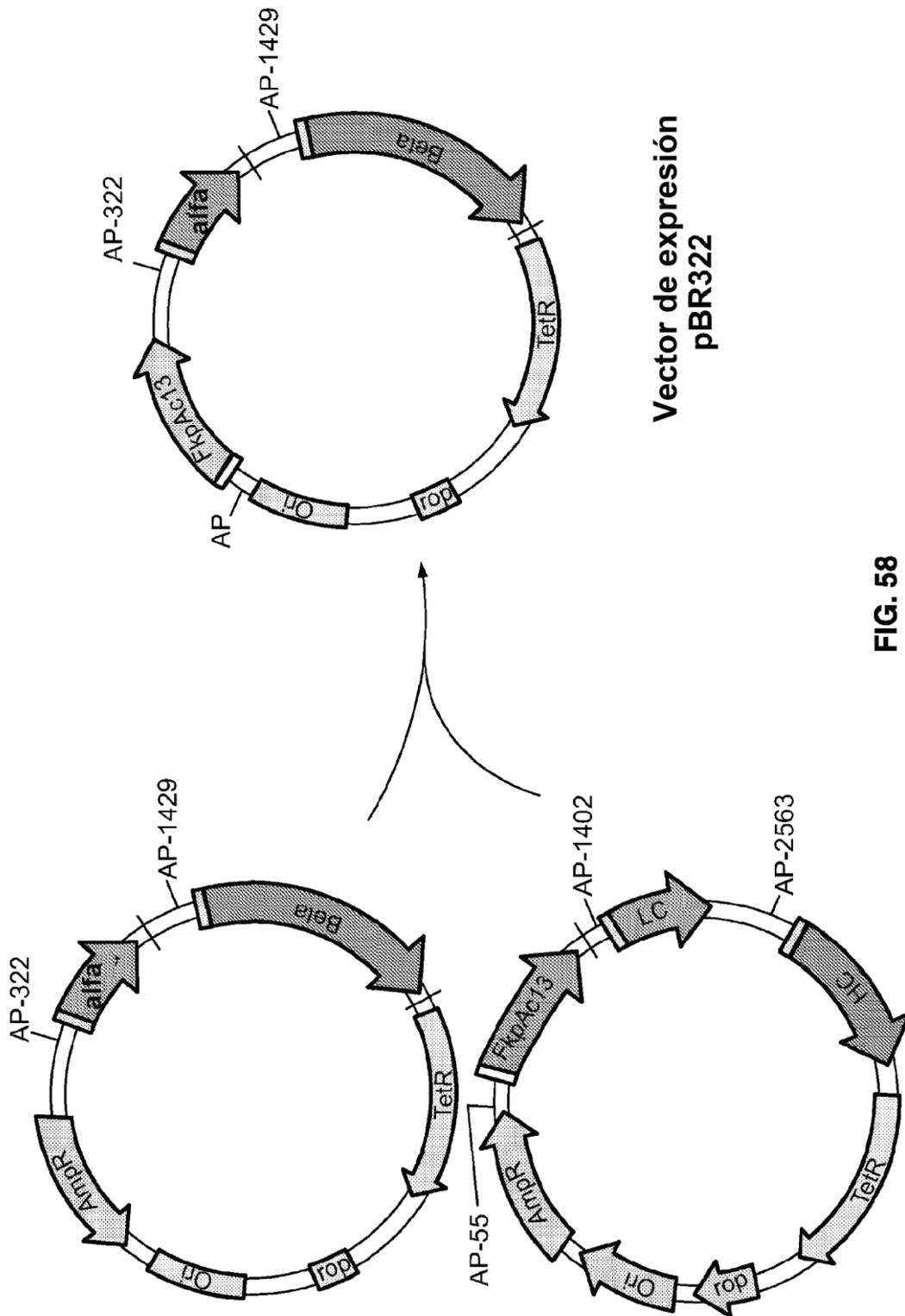


FIG. 58

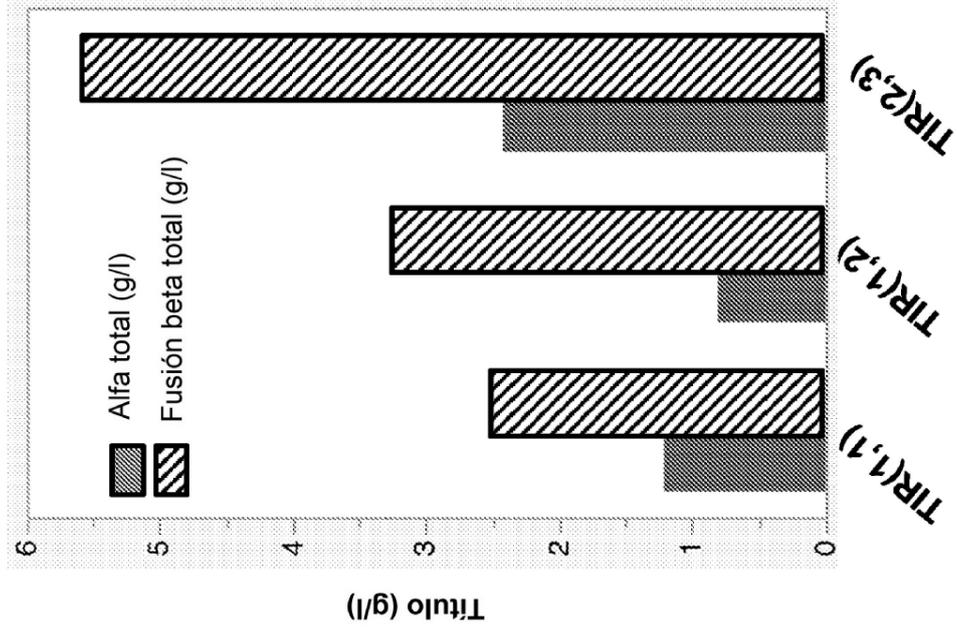


FIG. 59B

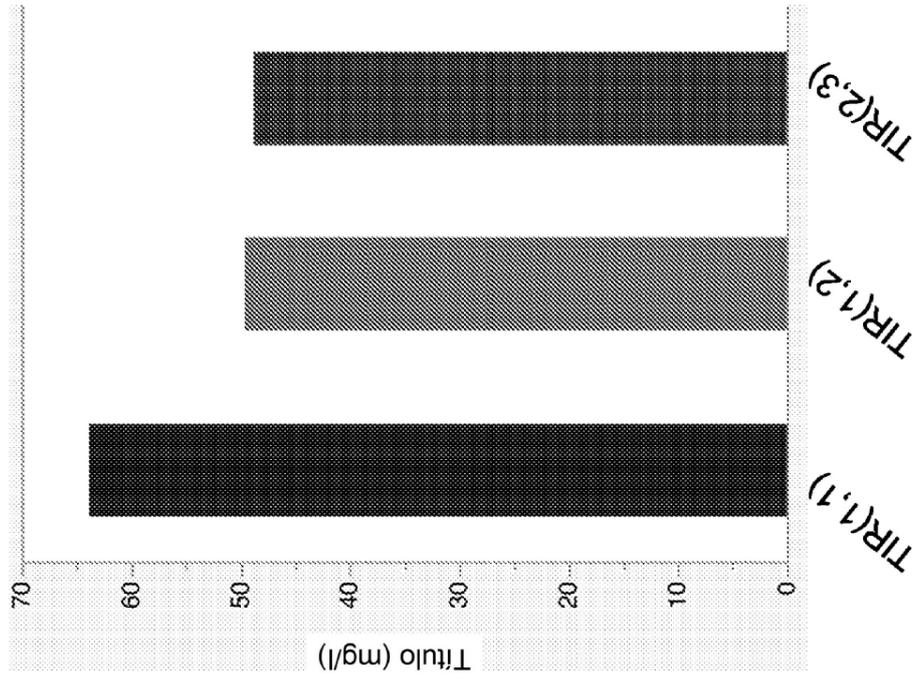


FIG. 59A

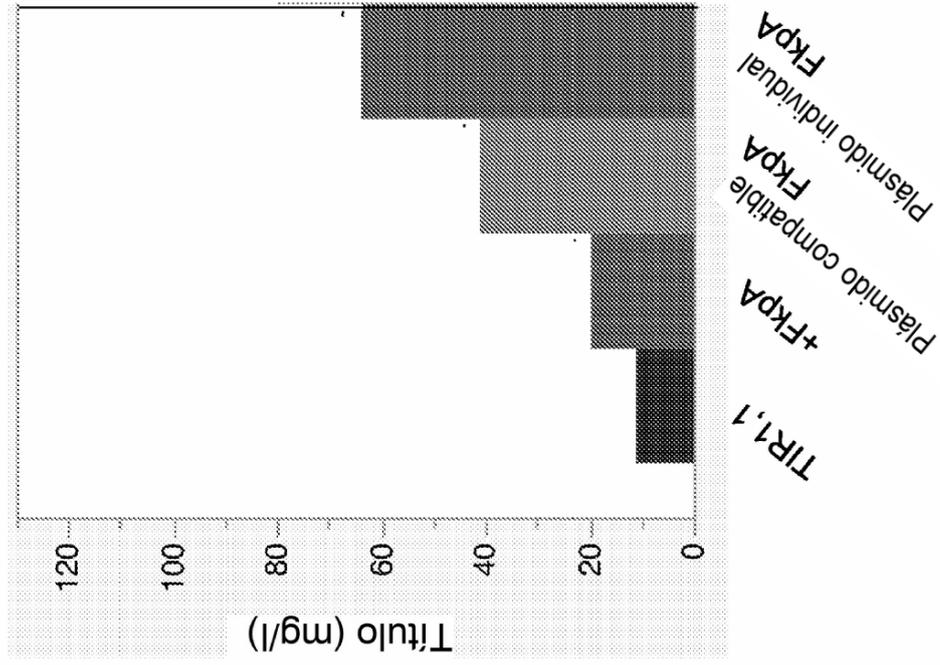


FIG. 60B

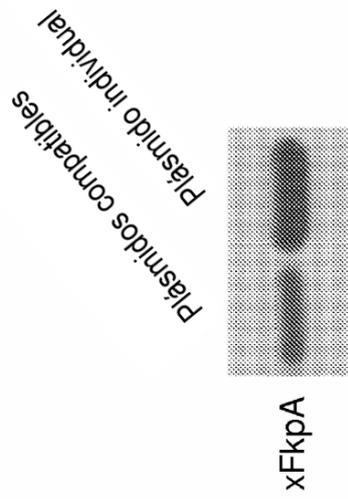


FIG. 60A

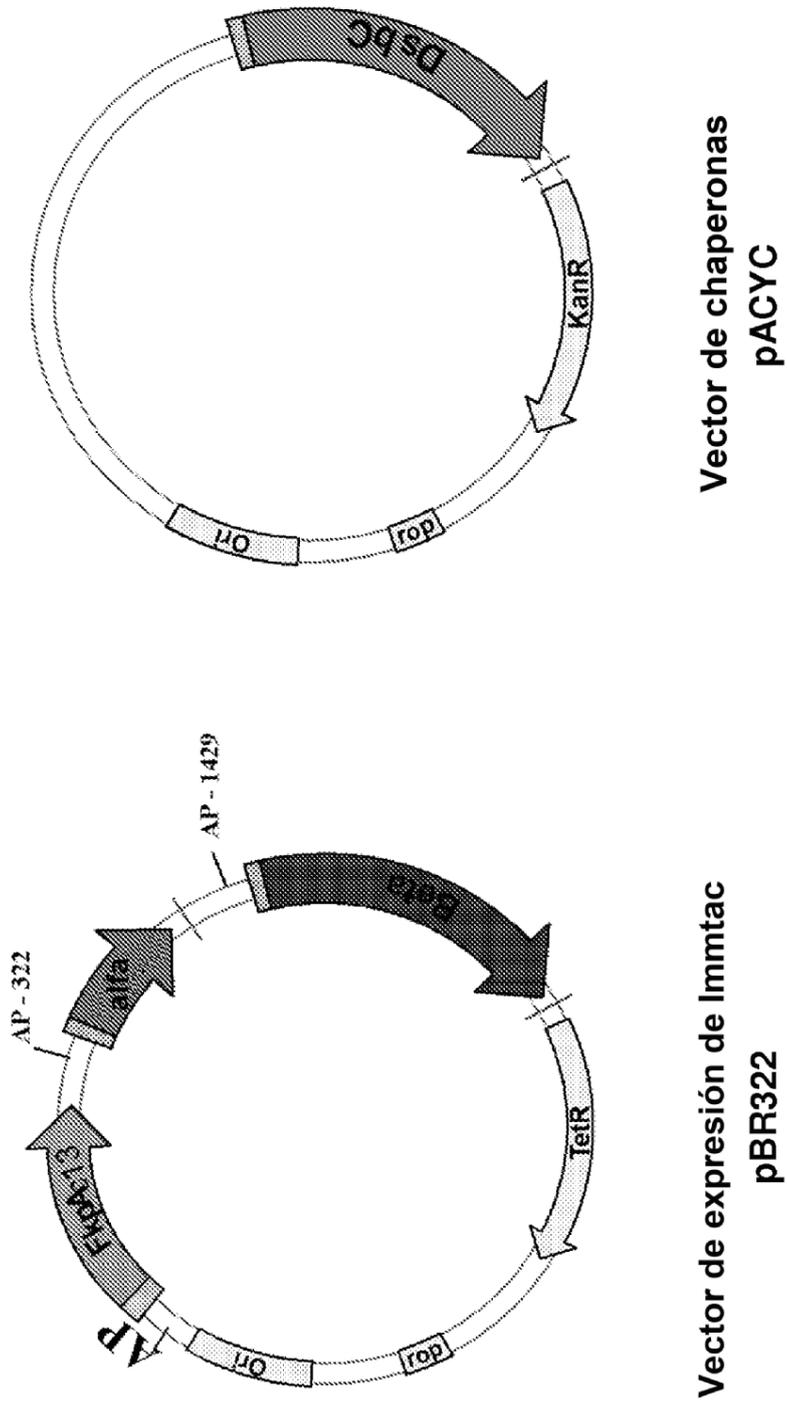


FIG. 61

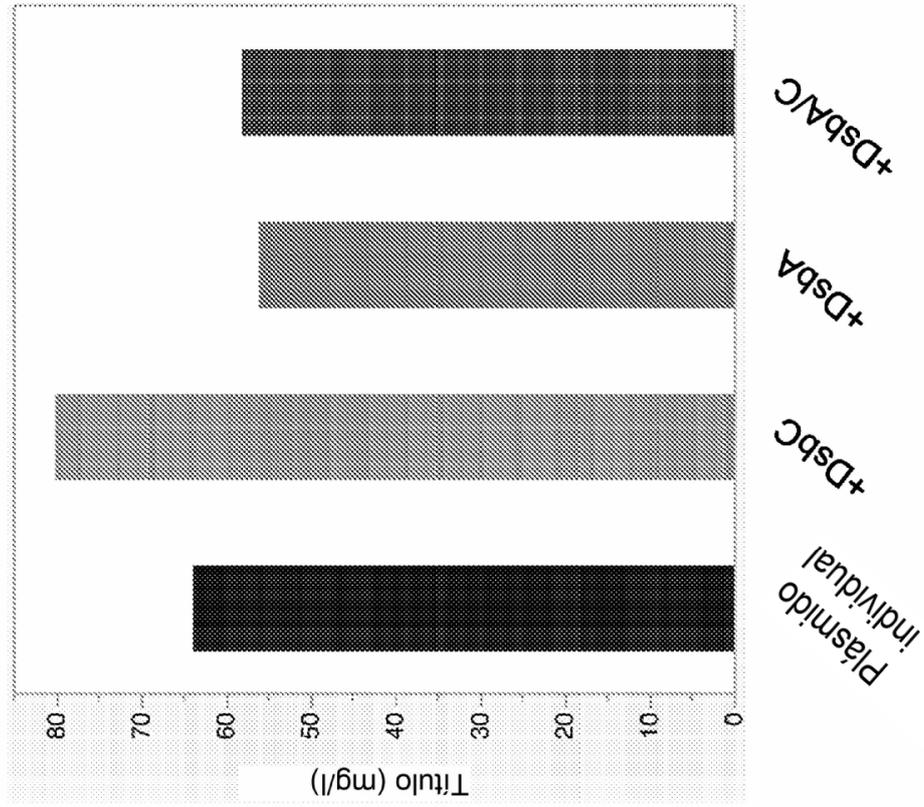


FIG. 62

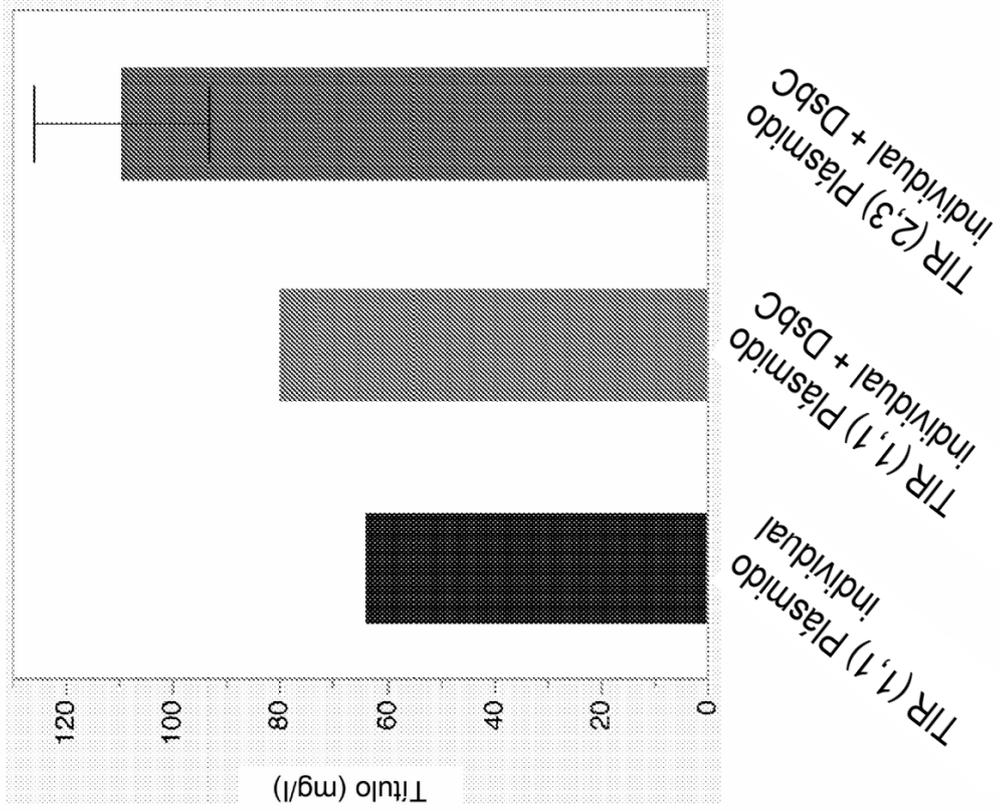


FIG. 63

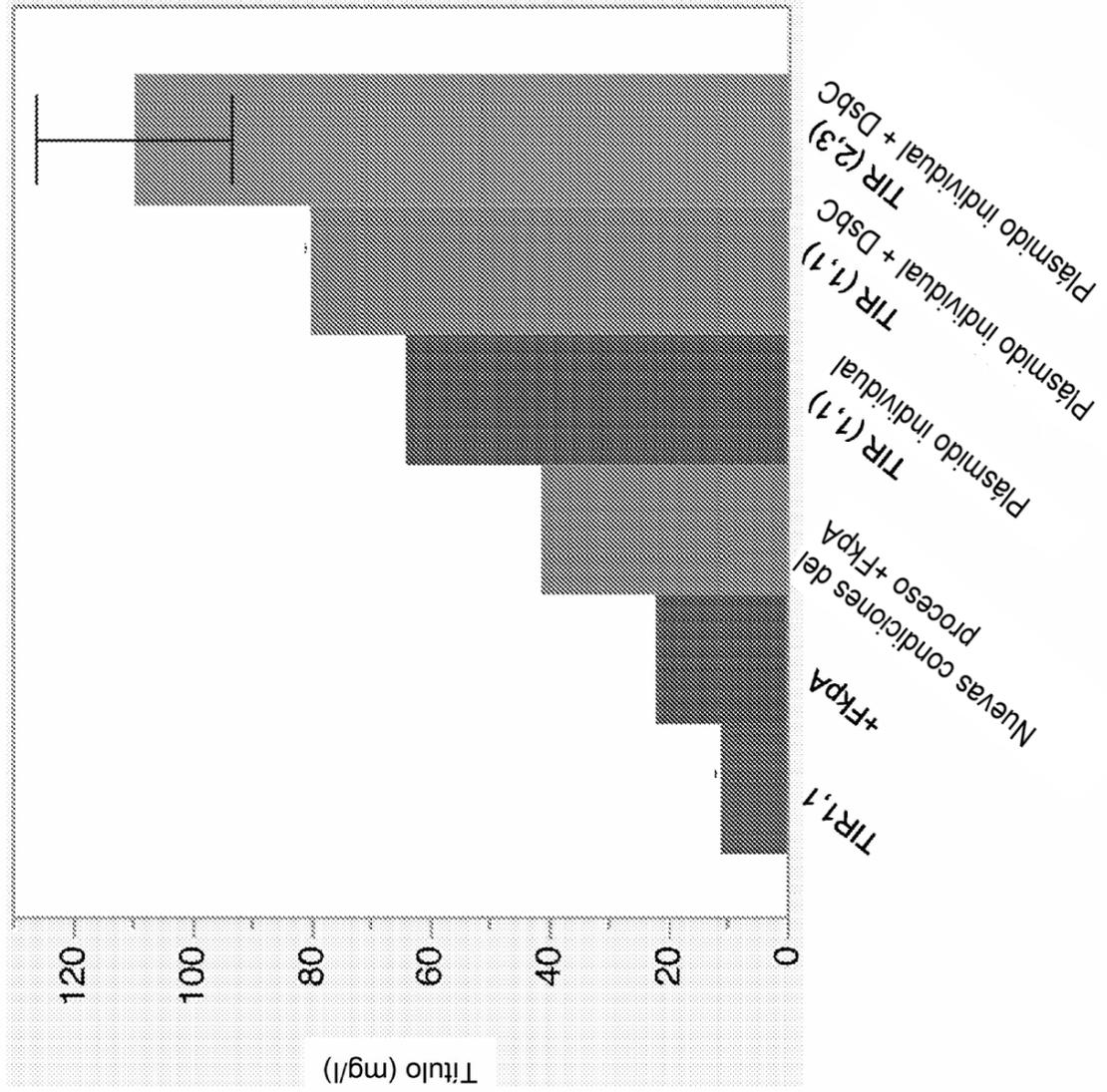


FIG. 64

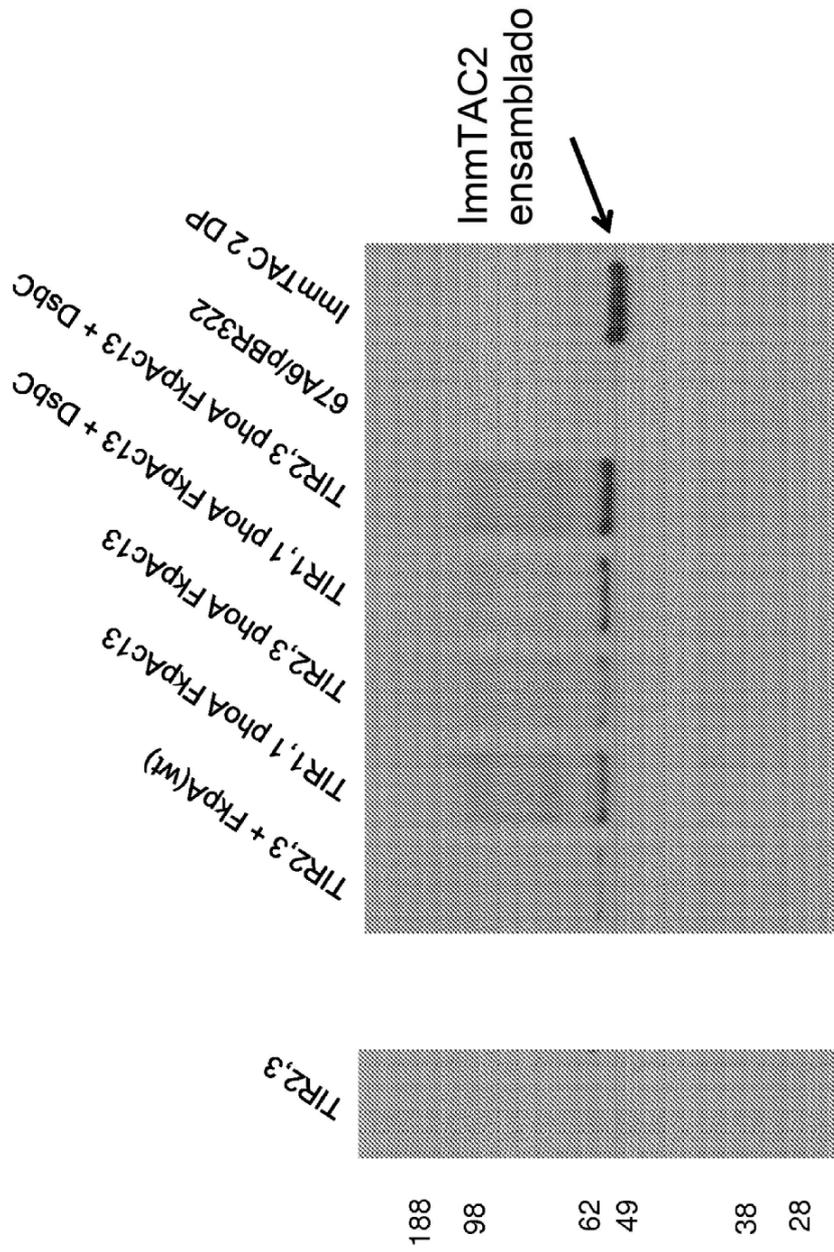


FIG. 65A

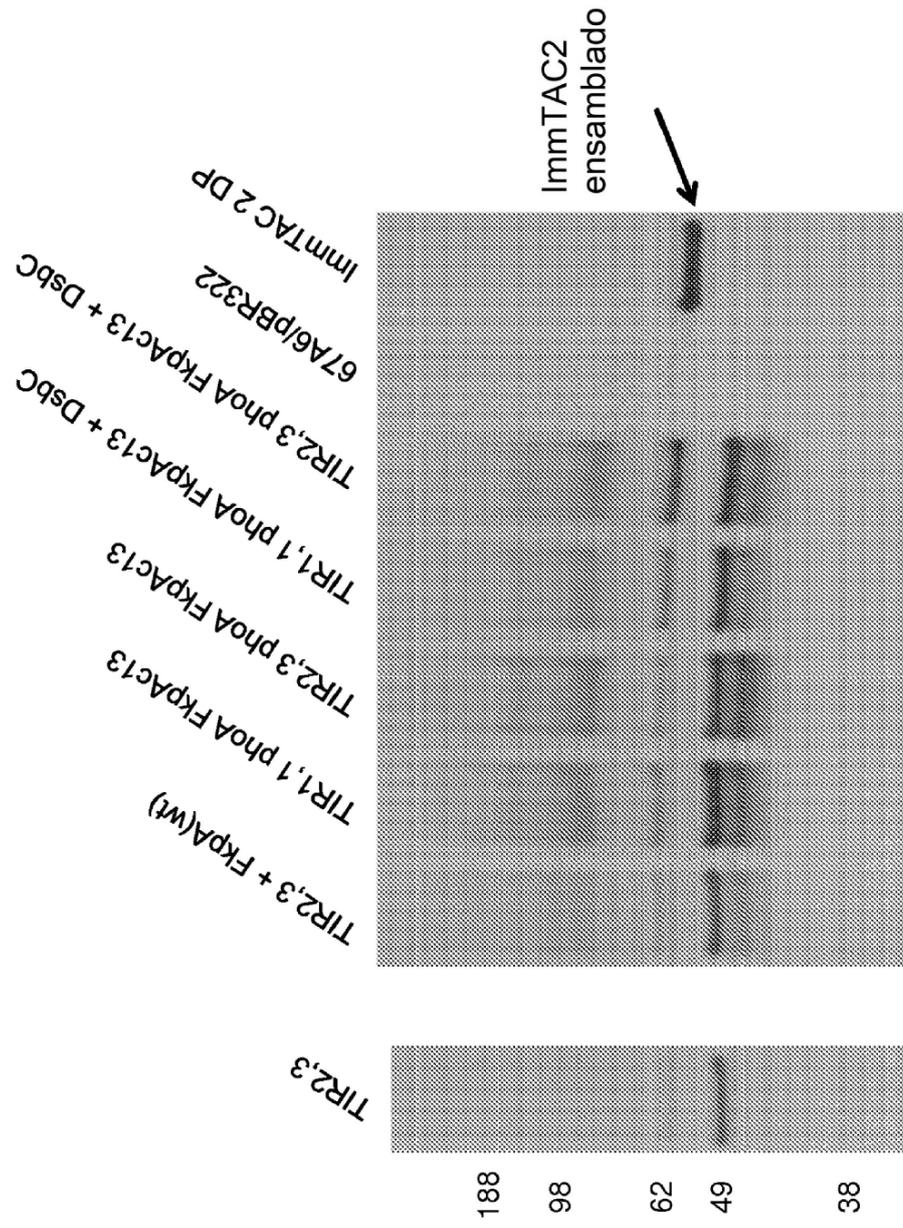


FIG. 65B