

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 726**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2016** **PCT/US2016/021059**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016** **WO16144824**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2016** **E 16712126 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 3265557**

54 Título: **DsbA y DsbC ultrapurificadas y procedimientos de preparación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

06.03.2015 US 201562129701 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

WONG, MARC;
YEE, LILIANA, T.;
LIM, AMY y
FONG, CHRIS, B.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 761 726 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

DsbA y DsbC ultrapurificadas y procedimientos de preparación y uso de las mismas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona procedimientos para producir polipéptidos de disulfuro oxidoreductasa A (DsbA) a niveles muy altos de pureza. También se proporcionan DsbA ultrapura y procedimientos de uso de la misma, por ejemplo, para su uso en inmunoensayos para mostrar la eliminación de DsbA de productos biológicos producidos en bacterias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos eucarióticos producidos en masa por expresión en células huésped bacterianas en condiciones de fermentación a menudo se modifica para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de las proteínas heteromultiméricas segregadas (por ejemplo, anticuerpos). La sobreexpresión de proteínas chaperonas, como las proteínas disulfuro oxidoreductasa (Dsb), incluyendo DsbA y DsbC, facilita el plegamiento y solubilidad apropiados de las proteínas heterólogas, tales como anticuerpos, producidas en células huésped bacterianas. La DsbA es un potente oxidante de tiol y el donador intermedio de enlaces disulfuro a proteínas segregadas. La DsbC cataliza la isomerización de enlaces disulfuro y puede intercambiar enlaces disulfuro plegados incorrectamente. Las proteínas Dsb son un catalizador principal de formación e isomerización de enlaces disulfuro en bacterias y promueven el plegamiento correcto de proteínas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210. Messens, J. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* 282(43):31302-31307 divulgan la DsbA como un catalizador suficiente para la formación de disulfuro en RNasa I. Se proporciona un esquema de purificación para DsbA marcada con histidina usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Urban, A. *et al.* (2001) *J. Bacteriol.* 183(2):587-596 divulgan DsbA de *Pseudomonas aeruginosa* que estabiliza una lipasa periplásmica. Se proporciona un esquema de purificación para DsbA marcada con histidina usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Kurz, M. *et al.* (2008) *Protein Express. Purif.* 59:266-273 divulgan la clonación, expresión, purificación y caracterización de una proteína similar a DsbA de *Walbachia pipientis*. Se proporciona un esquema de purificación para DsbA marcada con histidina usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Zapun, A. *et al.* (1993) *Biochem.* 32:5083-5092 divulgan que se requiere un enlace disulfuro reactivo y desestabilizado de DsbA para la formación de enlace disulfuro de proteína *in vivo*. Se purificó proteína DsbA natural por cromatografía de intercambio aniónico. Zhang, Y. *et al.* (2008) *Hybridoma* 27(2):131-134 divulgan la generación de anticuerpos monoclonales contra DsbA de *Escherichia coli*. Se proporciona un esquema de purificación para DsbA marcada con histidina usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. También se divulga la purificación de una proteína de fusión DsbA usando columnas de afinidad que contienen los anticuerpos monoclonales generados. Brown, DM y Pietrzyk, DJ (1989) *J. Chromat.* 466:291-300 divulgan la cromatografía de intercambio iónico de lecho mixto (MBIE) para la separación simultánea de analitos aniónicos y catiónicos. Zhan, X *et al.* (2004) *J. Bacter.* 186(3):654-660 divulgaron el análisis genético de la expresión de DsbC en *Escherichia coli*. La expresión de DsbC se midió mediante análisis por inmunoelectrotransferencia.

Para que las proteínas biofarmacéuticas recombinantes sean aceptables para su administración a pacientes humanos, es importante que las impurezas residuales resultantes del procedimiento de fabricación y purificación se eliminen del producto biológico final. Estos componentes del procedimiento incluyen proteínas de medio de cultivo, ligandos de afinidad por inmunoglobulinas, virus, endotoxina, ADN y proteínas de células huésped. Estas impurezas de células huésped incluyen proteínas de células huésped (HCP) específicas del procedimiento, que son impurezas relacionadas con el procedimiento en el producto biológico derivado de la tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, chaperonas DsbA y DsbC que se sobreexpresan para facilitar el plegamiento de proteínas. Si bien las HCP están típicamente presentes en la sustancia farmacéutica final en pequeñas cantidades (en partes por millón o nanogramos por miligramo del polipéptido recombinante pretendido), se reconoce que las HCP son indeseables y sus cantidades se deben minimizar. Por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) exige que los productos biofarmacéuticos destinados al uso humano *in vivo* estén lo más libres posible de impurezas extrañas, y requiere pruebas para la detección y cuantificación de impurezas potenciales, tales como HCP. Además, el Consejo Internacional de Armonización (ICH) proporciona directrices sobre los procedimientos de prueba y los criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos. Las directrices sugieren que, para HCP, se utilice un inmunoensayo sensible que pueda detectar una amplia gama de impurezas proteínicas. Se han desarrollado ensayos y reactivos para detectar inmunoglobulinas, ADN, endotoxinas, virus y HCP totales, por ejemplo, proteínas de *E. coli* (ECP) totales, pero dichos ensayos y reactivos no detectan con exactitud proteínas accesorias tales como DsbA o DsbC. Actualmente no existen reactivos comerciales o procedimientos analíticos de suficiente especificidad y sensibilidad para la detección y cuantificación de proteínas tales como DsbA o DsbC que típicamente no están expresadas en niveles altos en bacterias, pero pueden estar sobreexpresadas en células huésped bacterianas recombinantes para facilitar el plegamiento y la segregación de productos biológicos.

Los reactivos, procedimientos y kits para la detección de DsbA y DsbC son necesarios en particular cuando no existen

ensayos ni reactivos existentes de estabilidad, sensibilidad, especificidad o eficacia suficientes. La invención descrita en el presente documento cumple determinadas necesidades descritas anteriormente y proporciona otros beneficios.

BREVE SUMARIO

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para purificar un polipéptido de DsbA a partir de un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA, que comprende a) añadir polietilenimina (PEI) a una concentración final de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1,0 % a un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA, b) clarificar el lisado celular por centrifugación, c) aplicar el lisado celular clarificado que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio aniónico, d) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio aniónico para generar un eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA, e) aplicar el eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio catiónico, f) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio catiónico para generar un eluido del intercambio catiónico que comprende el polipéptido de DsbA purificado. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA se mantiene en la PEI durante al menos aproximadamente 16 horas antes de la cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, la concentración final de PEI en el lisado es de aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, el lisado que comprende el polipéptido de DsbA y la PEI está a un pH de aproximadamente 7,0.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico fuerte. En algunos modos de realización, el intercambiador aniónico fuerte comprende una amina cuaternaria. En otros modos de realización, la amina cuaternaria está unida a agarosa reticulada. En algunos modos de realización, el intercambiador aniónico es un intercambiador aniónico QSFF.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, la DsbA se eluye del material de cromatografía de aniones usando un gradiente de sal. En otros modos de realización, el gradiente de sal es un gradiente escalonado. En algunos modos de realización, el lisado clarificado comprende MOPS 10 mM, pH 7,1.

En algunos modos de realización o los modos de realización anteriores, la DsbA se eluye del material de cromatografía de intercambio aniónico con las siguientes etapas: aproximadamente un 15 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 para aproximadamente cuatro volúmenes de columna, aproximadamente un 20 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 para aproximadamente cuatro volúmenes de columna, aproximadamente un 25 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 hasta que la DsbA se eluya de la columna.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbA de la etapa b) se pasa a través de un filtro de 0,22 µm antes de la cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbA de la etapa b) se ajusta a pH de aproximadamente 9,0 antes de la cromatografía de intercambio aniónico.

En algunos modos de realización, el eluido del intercambio aniónico se recoge en fracciones. En algunos modos de realización, las fracciones son de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0 volúmenes de columna (VC). En algunos modos de realización, las fracciones se analizan por cromatografía de exclusión por tamaño antes de la cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, se seleccionan fracciones que comprenden al menos aproximadamente un 55 % de DsbA para su purificación adicional.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, el material de intercambio catiónico comprende un resto sulfopropilo. En algunos modos de realización, el resto sulfopropilo se une a una matriz de poli(estireno-divinilbenceno) reticulada. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es POROS HS 50 o equivalente. En algunos modos de realización, el eluido del intercambio aniónico de la etapa d) se ajusta a pH de aproximadamente 5,0 antes de la cromatografía de intercambio catiónico.

En algunos modos de realización, la DsbA se eluye del material de cromatografía catiónica usando un gradiente de sal. En algunos modos de realización, el material de cromatografía catiónica se lava con 5 volúmenes de columna de MES 12,5 mM. En algunos modos de realización, el gradiente de sal es un gradiente de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 60 % de MES 12,5 mM y NaCl 1 M sobre 15 volúmenes de columna. En algunos modos de realización, el eluido del intercambio catiónico se recoge en fracciones. En algunos modos de realización, las fracciones se analizan por cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que comprenden al menos aproximadamente un 95 % de DsbA.

En algunos modos de realización de cualquiera de los modos de realización anteriores, el polipéptido de DsbA es un polipéptido de DsbA de *Escherichia coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otros modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de DsbA es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la DsbA se expresa en una célula. En algunos modos de realización, la célula es una célula procariota. En otros modos de realización, la célula es una célula de *E. coli*. En algunos modos de

realización, la célula se genomanipula para expresar DsbA a niveles mayores que la expresión endógena de DsbA. En algunos modos de realización, la célula se lisa usando un microfluidizador.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de DsbA purificado por el procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización anteriores. En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de DsbA purificado, donde la composición comprende al menos aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica. En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de DsbA purificado, donde la composición comprende al menos aproximadamente un 98 % de polipéptido de DsbA monomérica. En algunos modos de realización, la composición comprende menos de aproximadamente un 2 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la composición comprende menos de aproximadamente un 1 % de especies de alto peso molecular. En algunos modos de realización, el porcentaje de polipéptido de DsbA monomérica se detecta mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, la composición comprende menos de aproximadamente un 5 % de impurezas. En algunos modos de realización, las impurezas son especies de polipéptidos de alto peso molecular y/o de bajo peso molecular en relación con DsbA natural o deseada. En algunos modos de realización, las impurezas son una o más de una proteína de *E. coli* (ECP), agregados de DsbA, fragmentos de DsbA, un ácido nucleico o un componente de medio de cultivo celular. En algunos modos de realización, la DsbA es estable a uno o más ciclos de congelación-descongelación. En algunos modos de realización, la DsbA es estable a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ciclos de congelación-descongelación. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura se usa como un patrón de referencia; por ejemplo, para determinar la cantidad o concentración de DsbA en una muestra de prueba. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura se usa como control positivo; por ejemplo, en un ensayo para determinar la presencia y/o cantidad de DsbA en una muestra.

En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbA en la composición se mide mediante cromatografía, electroforesis en gel de SDS poliacrilamida o análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbA en la composición se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En algunos modos de realización, la cromatografía es cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, SEC-HPLC). En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbA en la composición se mide mediante electroforesis en gel SDS usando una tinción con proteína fluorescente o una tinción con plata. En algunos modos de realización, la presencia de polipéptidos que no son de DsbA en la composición se identifica por la presencia de especies identificadas mediante electroforesis en gel que no son inmunorreactivas con anticuerpos anti-DsbA como se muestra por análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la presencia de agregados del polipéptido de DsbA en la composición se identifica por la presencia de especies con un peso molecular mayor que la DsbA natural mediante análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la presencia de fragmentos del polipéptido de DsbA en la composición se identifica mediante la presencia de especies con un peso molecular menor que la DsbA natural mediante análisis por inmunoelectrotransferencia.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para generar anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, que comprenden exponer un animal a la DsbA ultrapura, purificada como se describe anteriormente. En otros modos de realización, el procedimiento comprende recoger sueros del animal en el que los sueros comprenden anticuerpos que se unen específicamente a DsbA. En algunos modos de realización, los sueros comprenden anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbA. En algunos aspectos, la invención proporciona uno o más anticuerpos monoclonales aislados de los sueros. En algunos modos de realización, el animal es una cabra, un conejo, un ratón, una cobaya, un hámster, una rata, un burro o un pollo.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para purificar anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, que comprenden poner en contacto una composición que comprende anticuerpos anti-DsbA con material de cromatografía que comprende DsbA ultrapura unida a un material de soporte, lavar el material de cromatografía para eliminar compuestos no unidos y eluir los anticuerpos anti-DsbA. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura comprende al menos aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente un 5 % de impurezas, menos de aproximadamente un 1 % de impurezas o menos de aproximadamente un 0,1 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura se prepara mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos se preparan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, menos de un 1 % de los anticuerpos se unen específicamente a compuestos que no son DsbA.

En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbA, en las que los anticuerpos policlonales se generan exponiendo un animal a cualquiera de las composiciones de DsbA descritas anteriormente. En algunos modos de realización, los anticuerpos policlonales se recogen de los sueros del animal. En algunos modos de realización, la invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a DsbA, en las que los anticuerpos monoclonales se generan exponiendo un animal a cualquiera de las composiciones de DsbA descritas anteriormente. En algunos modos de realización, el animal es una cabra, un conejo, un ratón, una cobaya, un hámster, una rata, un

burro o un pollo.

En algunos modos de realización, la invención proporciona un procedimiento para analizar una muestra de polipéptido recombinante para determinar la presencia y/o cantidad de DsbA, que comprende detectar DsbA en la muestra usando un inmunoensayo y comparar la cantidad de DsbA detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, se prueban una serie de concentraciones diferentes de la DsbA del patrón de referencia para establecer una correlación entre el nivel de detección y la concentración de DsbA en el patrón de referencia. La concentración de DsbA en una muestra de prueba se puede determinar comparando el nivel de detección de DsbA en la muestra de prueba con la detección de las concentraciones conocidas de DsbA en el patrón de referencia. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente un 1 % de impurezas. En algunos modos de realización, el patrón de referencia de DsbA ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura se unen menos de aproximadamente cualquiera de los compuestos al 1 % que no son DsbA. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura son anticuerpos policlonales. En otros modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura son anticuerpos monoclonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura se usan como anticuerpos de captura en el inmunoensayo. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura se usan como anticuerpos de detección. En algunos modos de realización, los anticuerpos de detección se conjugan con un agente de detección (por ejemplo, una peroxidasa de rábano picante). En algunos modos de realización, la DsbA es una DsbA de *E. coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*). En algunos modos de realización, la célula huésped sobreexpresa DsbA (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresaba DsbA). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular o se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algún modo de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos de inmunoensayo para detectar DsbA en una muestra, por ejemplo, en los que la muestra se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante o una línea de células huésped, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto un anticuerpo de captura que se une a DsbA con la muestra generando de este modo un material de combinación de muestra-anticuerpo de captura; (b) poner en contacto un anticuerpo de detección que se une a DsbA con el material de combinación de muestra-anticuerpo de captura; y (c) detectar el anticuerpo unido al material de combinación de muestra-anticuerpo de captura. En otros modos de realización, el procedimiento comprende cuantificar el nivel del anticuerpo de detección unido usando una curva de valoración patrón. En otros modos de realización, el procedimiento comprende calcular una cantidad de DsbA presente en la muestra en base al nivel del anticuerpo de detección unido. En algunos modos de realización, la cantidad de DsbA presente en la muestra se determina comparando la curva de valoración patrón con una curva de valoración patrón generada con una composición de DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, la composición de DsbA ultrapura comprende al menos aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica. En algunos modos de realización, la composición de DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente un 5 % de impurezas, menos de aproximadamente un 1 % de impurezas o menos de aproximadamente un 0,1 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura en la composición se prepara mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el anticuerpo de captura se une específicamente a DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección se une específicamente a DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, el anticuerpo que se une específicamente a DsbA ultrapura es un anticuerpo policlonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección que se une a DsbA se conjuga con una peroxidasa de rábano picante. En algunos modos de realización, el inmunoensayo es un ensayo de tipo sándwich. En otros modos de realización, el ensayo de tipo sándwich es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). En algunos modos de realización, la DsbA es una DsbA de *E. coli*. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante o la línea de células huésped se obtiene de *E. coli*. En algunos modos de realización, la línea de células huésped sobreexpresa DsbA (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresa DsbA). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular. En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de la preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante contenido en la preparación de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un semianticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4.

En algunos modos de realización, la invención proporciona un ensayo de calidad para una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo el ensayo de liberación someter la composición farmacéutica a un inmunoensayo como se describe en el presente documento, en el que la detección de DsbA en el inmunoensayo indica que la composición farmacéutica no es adecuada para la administración terapéutica a un animal. En algunos modos de realización, una cantidad de DsbA en la composición

farmacéutica de menos de aproximadamente 1 ppm indica que la composición farmacéutica es adecuada para su administración al animal. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara a partir de una célula de *E. coli*. En algunos modos de realización, la célula bacteriana sobreexpresa DsbA. En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular. En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de la preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante contenido en la preparación de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un semianticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para purificar un polipéptido de DsbC a partir de un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbC que comprenden a) añadir polietilenimina (PEI) a una concentración final de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1,0 % a un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbC, b) clarificar el lisado celular por centrifugación, c) aplicar el lisado celular clarificado que comprende el polipéptido de DsbC a un material de cromatografía de intercambio aniónico, d) eluir el polipéptido de DsbC del material de cromatografía de intercambio aniónico para generar un eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbC, e) aplicar el eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbC a un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), f) eluir el polipéptido de DsbC del material de HIC para generar un eluido de la HIC, g) aplicar el eluido de la HIC que comprende el polipéptido de DsbC a una cromatografía de exclusión por tamaño, h) recoger fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño que comprende el polipéptido de DsbC purificada. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende el polipéptido de DsbC se mantiene en la PEI durante al menos aproximadamente 16 horas antes de la cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, la concentración final de PEI en el lisado es de aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, el lisado que comprende el polipéptido de DsbC y la PEI está a un pH de aproximadamente 7,0.

En algunos modos de realización del modo de realización anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico débil. Aún en otros modos de realización, el intercambiador aniónico débil comprende una amina cuaternaria. Aún en otros modos de realización, la amina cuaternaria está unida a agarosa reticulada.

En algunos modos de realización, la DsbC se eluye del material de cromatografía catiónica usando un gradiente de sal. En otros modos de realización, el gradiente de sal es un gradiente lineal. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico se lava en MOPS 10 mM. En algunos modos de realización, el gradiente de sal es un gradiente de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 60 % de MOPS 10 mM y NaCl 250 M sobre 15 volúmenes de columna.

En algunos modos de realización del modo de realización anterior, el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbC de la etapa b) se pasa a través de un filtro de 0,22 µm antes de la cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbC de la etapa b) se ajusta a pH de aproximadamente 8,0 antes de la cromatografía de intercambio aniónico.

En algunos modos de realización, el eluido del intercambio aniónico se recoge en fracciones. En algunos modos de realización, las fracciones se analizan por cromatografía de exclusión por tamaño antes de la cromatografía de interacción hidrófoba. En algunos modos de realización, se seleccionan fracciones que comprenden al menos aproximadamente un 25 % de DsbC para su purificación adicional.

En algunos modos de realización del modo de realización anterior, el material de HIC comprende un resto fenilo. En otros modos de realización, el resto fenilo está unido a una agarosa reticulada. En algunos modos de realización, el eluido del intercambio aniónico se acondiciona para contener sulfato de sodio aproximadamente 0,54 M y PO₄ aproximadamente 50 mM, aproximadamente pH 7 antes de la cromatografía HIC. En algunos modos de realización, la DsbC se eluye del material de HIC usando agua. En algunos modos de realización, el eluido de HIC se recoge en fracciones. En otros modos de realización, se agrupan fracciones que comprenden DsbC.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, el material de cromatografía de exclusión por tamaño comprende un compuesto esférico de agarosa reticulada y dextrano. En algunos modos de realización, la parte no adsorbida de la exclusión por tamaño se recoge en fracciones. En algunos modos de realización, el eluido de la HIC se ultrafiltra antes de la cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que comprenden DsbC.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, el polipéptido de DsbC es un polipéptido de DsbC de *Escherichia coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de DsbC es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, la DsbC se expresa en una célula. En algunos modos de realización, la célula es una célula procariota. En algunos modos de realización, la célula es una célula de *E. coli*. En algunos modos de realización, la célula se genomanipula para expresar DsbC a niveles mayores que la expresión endógena de DsbC. En algunos modos de realización, la célula se lisa usando un microfluidizador.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición que comprende un polipéptido de DsbC purificado por el procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización anteriores. En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de DsbC purificada, donde la composición comprende al menos aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la composición comprende al menos aproximadamente un 98 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la composición comprende al menos aproximadamente un 99 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la composición comprende al menos aproximadamente un 99,5 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la composición comprende menos de aproximadamente un 2 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la composición comprende menos de aproximadamente un 1 % de especies de alto peso molecular. En algunos modos de realización, el porcentaje de polipéptido de DsbC monomérica se detecta mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, las impurezas son especies de polipéptidos de alto peso molecular y/o de bajo peso molecular en relación con DsbC natural o deseada. En algunos modos de realización, las impurezas son una o más de una proteína de *E. coli* (ECP), agregados de DsbC, fragmentos de DsbC, un ácido nucleico o un componente de medio de cultivo celular. En algunos modos de realización, la DsbC es estable a uno o más ciclos de congelación-descongelación. En algunos modos de realización, la DsbC es estable a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ciclos de congelación-descongelación. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura se usa como un patrón de referencia; por ejemplo, para determinar la cantidad o concentración de DsbC en una muestra de prueba. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura se usa como control positivo; por ejemplo, en un ensayo para determinar la presencia y/o cantidad de DsbC en una muestra.

En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbC en la composición se mide mediante cromatografía, electroforesis en gel de SDS poliacrilamida o análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbC en la composición se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En algunos modos de realización, la cromatografía es cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, SEC-HPLC). En algunos modos de realización, la pureza del polipéptido de DsbC en la composición se mide mediante electroforesis en gel SDS usando una tinción con proteína fluorescente o una tinción con plata. En algunos modos de realización, la presencia de polipéptidos que no son de DsbC en la composición se identifica por la presencia de especies identificadas mediante electroforesis en gel que no son inmunorreactivas con anticuerpos anti-DsbC como se muestra por análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la presencia de agregados del polipéptido de DsbC en la composición se identifica por la presencia de especies con un peso molecular mayor que la DsbC natural mediante análisis por inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, la presencia de fragmentos del polipéptido de DsbC en la composición se identifica mediante la presencia de especies con un peso molecular menor que la DsbC natural mediante análisis por inmunoelectrotransferencia.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para generar anticuerpos que se unen específicamente a DsbC, que comprenden exponer un animal a la DsbC ultrapura, purificada como se describe anteriormente. En otros modos de realización, el procedimiento comprende recoger sueros del animal en el que los sueros comprenden anticuerpos que se unen específicamente a DsbC. En algunos modos de realización, los sueros comprenden anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbC. En algunos aspectos, la invención proporciona uno o más anticuerpos monoclonales aislados de los sueros. En algunos modos de realización, el animal es una cabra, un conejo, un ratón, una cobaya, un hámster, una rata, un burro o un pollo.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para purificar anticuerpos que se unen específicamente a DsbC, que comprenden poner en contacto una composición que comprende anticuerpos anti-DsbC con material de cromatografía que comprende DsbC ultrapura unida a un material de soporte, lavar el material de cromatografía para eliminar compuestos no unidos y eluir los anticuerpos anti-DsbC. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura comprende más de aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente un 5 % de impurezas, menos de aproximadamente un 1 % de impurezas o menos de aproximadamente un 0,1 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura se prepara mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos se preparan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, menos de un 1 % de los anticuerpos se unen específicamente a compuestos que no son DsbC.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbC, en las que los anticuerpos policlonales se generan exponiendo un animal a cualquiera de las composiciones de DsbC descritas anteriormente. En algunos modos de realización, los anticuerpos policlonales se recogen de los sueros del animal. En algunos modos de realización, la invención proporciona composiciones que

comprenden anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a DsbC, en las que los anticuerpos monoclonales se generan exponiendo un animal a cualquiera de las composiciones de DsbC descritas anteriormente. En algunos modos de realización, el animal es una cabra, un conejo, un ratón, una cobaya, un hámster, una rata, un burro o un pollo.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona un procedimiento para analizar una muestra de polipéptido recombinante para determinar la presencia y/o cantidad de DsbC, que comprende detectar DsbC en la muestra usando un inmunoensayo y comparar la cantidad de DsbC detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, se somete a prueba una serie de concentraciones diferentes de la DsbC del patrón de referencia para establecer una correlación entre el nivel de detección y la concentración de DsbC en el patrón de referencia. La concentración de DsbC en una muestra de prueba se puede determinar comparando el nivel de detección de DsbC en la muestra de prueba con la detección de las concentraciones conocidas de DsbC en el patrón de referencia. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente un 1 % de impurezas. En algunos modos de realización, el patrón de referencia de DsbC ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se unen menos de aproximadamente cualquiera de los compuestos al 1 % que no son DsbC. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura son anticuerpos policlonales. En otros modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura son anticuerpos monoclonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se usan como anticuerpos de captura en el inmunoensayo. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se usan como anticuerpos de detección. En algunos modos de realización, los anticuerpos de detección se conjugan con un agente de detección (por ejemplo, una peroxidasa de rábano picante). En algunos modos de realización, la DsbC es una DsbC de *E. coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*). En algunos modos de realización, la célula huésped sobreexpresa DsbC (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresaba DsbC). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular o se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algún modo de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de inmunoensayo para detectar DsbC en una muestra, por ejemplo, en los que la muestra se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante o una línea de células huésped, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto un anticuerpo de captura que se une a DsbC con la muestra generando de este modo un material de combinación de muestra-anticuerpo de captura; (b) poner en contacto un anticuerpo de detección que se une a DsbC con el material de combinación de muestra-anticuerpo de captura; y (c) detectar el anticuerpo unido al material de combinación de muestra-anticuerpo de captura. En otros modos de realización, el procedimiento comprende cuantificar el nivel del anticuerpo de detección unido usando una curva de valoración patrón. En otros modos de realización, el procedimiento comprende calcular una cantidad de DsbC presente en la muestra en base al nivel del anticuerpo de detección unido. En algunos modos de realización, la cantidad de DsbC presente en la muestra se determina comparando la curva de valoración patrón con una curva de valoración patrón generada con una composición de DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, la composición de DsbC ultrapura comprende al menos aproximadamente un 95 % de polipéptido de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la composición de DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente un 5 % de impurezas, menos de aproximadamente un 1 % de impurezas o menos de aproximadamente un 0,1 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura en la composición se prepara mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el anticuerpo de captura se une específicamente a DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección se une específicamente a DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, el anticuerpo que se une específicamente a DsbC ultrapura es un anticuerpo policlonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección que se une a DsbC se conjuga con una peroxidasa de rábano picante. En algunos modos de realización, el inmunoensayo es un ensayo de tipo sándwich. En otros modos de realización, el ensayo de tipo sándwich es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). En algunos modos de realización, la DsbC es una DsbC de *E. coli*. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante o la línea de células huésped se obtiene de *E. coli*. En algunos modos de realización, la línea de células huésped sobreexpresa DsbC (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresa DsbC). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular. En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de la preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante contenido en la preparación de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un semianticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona un ensayo de calidad para una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo el ensayo de

liberación someter la composición farmacéutica a un inmunoensayo como se describe en el presente documento, en el que la detección de DsbC en el inmunoensayo indica que la composición farmacéutica no es adecuada para la administración terapéutica a un animal. En algunos modos de realización, una cantidad de DsbC en la composición farmacéutica de menos de aproximadamente 1 ppm indica que la composición farmacéutica es adecuada para su administración al animal. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara a partir de una célula de *E. coli*. En algunos modos de realización, la célula bacteriana sobreexpresa DsbC. En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular. En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de la preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algunos modos de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante contenido en la preparación de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un semianticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante es una IgG1, una IgG2, una IgG3 o una IgG4.

En algunos aspectos, la invención proporciona kits para la detección de DsbA en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo dicho kit anticuerpos anti-DsbA preparados por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o una composición de cualquiera de los anticuerpos anti-DsbA descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona kits para la detección de DsbC en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo dicho kit anticuerpos anti-DsbC preparados por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o una composición de cualquiera de los anticuerpos anti-DsbC descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención proporciona kits para la detección de DsbA y la divulgación proporciona kits para la detección de DsbC en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo dicho kit anticuerpos anti-DsbA y anticuerpos anti-DsbC preparados por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o una composición de cualquiera de los anticuerpos anti-DsbA y cualquiera de los anticuerpos anti-DsbC descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, los kits comprenden además DsbA y/o DsbC ultrapuras para su uso como un patrón de referencia en la generación de curvas patrón para cuantificar DsbA y/o DsbC en una muestra. En algunos modos de realización, los kits comprenden además DsbA y/o DsbC ultrapuras para su uso como controles positivos en un ensayo para detectar DsbA y/o DsbC en una muestra.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra cromatogramas que muestran la cromatografía de exclusión por tamaño de fracciones de QSFF para la purificación de DsbA. De arriba abajo, los cromatogramas representan las siguientes fracciones: carga, fracción 3, fracción 7, fracción 10, fracción 11 y fracción 15.

La figura 2 muestra la electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (PAGE) de las fracciones de agrupación de Poros HS para la purificación de DsbA.

La figura 3 muestra cromatografías de cromatografía de exclusión por tamaño de fracciones de carga de Poros y de agrupación de Poros para la purificación de DsbA.

La figura 4 muestra una inmunoelectrotransferencia de fracciones de agrupación de Poros HS de DsbA. La agrupación simulada contiene principalmente la molécula de DsbA.

La figura 5 es una electroforesis en gel de SDS poliacrilamida de fracciones para la purificación de DsbC.

La figura 6A muestra un cromatograma de cromatografía DEAE FF para la purificación de DsbC. La figura 6B muestra un aumento de la parte de elución presentada en la figura 6A.

La figura 7 muestra SDS PAGE de fracciones DEAE-FF para la purificación de DsbC.

Las figuras 8A y 8B muestran electroforesis de muestras cromatográficas en la purificación de DsbC. La figura 8A es una inmunoelectrotransferencia que usa anti-DsbC-HRP como agente de detección. La figura 8B es una SDS PAGE de fracciones, teñida con azul de Coomassie.

La figura 9 muestra una SDS-PAGE de fracciones SPFF.

La figura 10 muestra una SDS-PAGE usada en el cribado de cromatografías HIC para la purificación de DsbC.

La figura 11 muestra una SDS-PAGE usada en el cribado de cromatografías HIC para la purificación de DsbC.

La figura 12 muestra una SDS-PAGE de fracciones cromatográficas de HIC en la purificación de DsbC.

La figura 13 muestra una SDS-PAGE de fracciones cromatográficas de superdex 75 de DsbC.

5 La figura 14 muestra un cromatograma que muestra una cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de la DsbC formulada.

10 La figura 15 muestra una SDS PAGE de DsbA y DsbC. Se proporcionan muestras que no están en condiciones reductoras en las columnas de la izquierda. Se proporcionan muestras en condiciones reductoras en las columnas de la derecha.

15 La figura 16 muestra una comparación de la agrupación por afinidad de anti-DsbC en un ELISA de unión directa. Los cuadrados representan material fraccionado (94 % del pico principal), los círculos representan material no fraccionado (78 % del pico principal).

La figura 17 muestra los resultados de un ELISA que usa la agrupación por afinidad de anti-DsbC en Superdex 200 agregado baja.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La invención proporciona procedimientos para generar composiciones ultrapuras de DsbA y la divulgación proporciona procedimientos para generar composiciones ultrapuras de DsbC. Dichas composiciones se usan para generar anticuerpos que son altamente específicos para DsbA o DsbC. Los anticuerpos a su vez son útiles para la detección de DsbA y DsbC en polipéptidos recombinantes preparados en cultivos de fermentación bacteriana donde DsbA y DsbC se sobreexpresan para facilitar el plegado y ensamblaje de polipéptidos recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de liberación en el desarrollo de una formulación farmacéutica de los polipéptidos recombinantes tales como anticuerpos.

I. Definiciones

30 El término "detección" se usa en el presente documento en el sentido más amplio para incluir mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de una molécula diana. La detección incluye identificar la mera presencia de la molécula diana en una muestra, así como determinar si la molécula diana está presente en la muestra a niveles detectables.

35 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y se puede interrumpir por moléculas distintas de aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se haya modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usan en el presente documento engloban específicamente anticuerpos.

45 Polipéptido "purificado" (por ejemplo, anticuerpo o inmunoconjugado) significa que el polipéptido se ha incrementado en pureza, de modo que exista en una forma que sea más pura de la que existe en su entorno natural y/o cuando inicialmente se sintetiza y/o amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

50 Como se usa en el presente documento, "DsbA ultrapura" y "DsbC ultrapura" se refieren a composiciones de DsbA o DsbC en las que al menos aproximadamente un 95 % de la proteína en la composición es la proteína deseada, DsbA monomérica o DsbC monomérica. En algunos ejemplos, DsbA ultrapura y DsbC ultrapura comprende al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de DsbA monomérica o DsbC monomérica. En algunos modos de realización, la DsbA monomérica o la DsbC monomérica se determina mediante SEC.

55 Cuando se usa en referencia a un polipéptido, las proteínas "Dsb" se refieren a disulfuro oxidoreductasas bacterianas. Las disulfuro oxidoreductasas bacterianas son miembros de la familia de enzimas de enlaces disulfuro. Los miembros de la familia Dsb incluyen DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y DsbG. La DsbA forma enlaces disulfuro intracatenarios a medida que emergen péptidos en el periplasma de la célula y la DsbC sirve como un enlace disulfuro isomerasa durante el plegamiento oxidativo de la proteína en el periplasma de la célula.

60 Como se usa en el presente documento, a la "DsbA" también se la puede conocer como proteína periplásmica disulfuro isomerasa I. Una proteína DsbA ejemplar es DsbA de *E. coli*. La secuencia de aminoácidos de la DsbA de *E. coli* se proporciona por el NCBI con el n.º de acceso NP_418297 (SEQ ID NO:1) y la secuencia de ácido nucleico del gen dsbA de *E. coli* se proporciona por el NCBI con el n.º de acceso NC_000913.3 o EcoGene:EG11297 (SEQ ID NO:2).

Como se usa en el presente documento, a la "DsbC" también se la puede conocer como proteína periplásmica disulfuro isomerasa II. Una proteína DsbC ejemplar es DsbC de *E. coli*. La secuencia de aminoácidos de la DsbC de *E. coli* se proporciona por el NCBI con el n.º de acceso NP 417369.1 (SEQ ID NO:3) y la secuencia de ácido nucleico del gen dsbC de *E. coli* se proporciona por el NCBI con el n.º de acceso NC_000913.3 o EcoGene:EG11070 (SEQ ID NO:4).

Una "muestra" se refiere a una pequeña parte de una cantidad mayor de material. En general, las pruebas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento se realizan en una muestra. La muestra se obtiene típicamente a partir de una preparación de polipéptido recombinante obtenida, por ejemplo, de líneas celulares que expresan polipéptidos recombinantes cultivados, también denominadas en el presente documento "líneas celulares de producto", o de células huésped cultivadas. Como se usa en el presente documento, las "células huésped" no contienen genes para la expresión de polipéptidos recombinantes de interés o productos. Se puede obtener una muestra de, por ejemplo, pero sin limitarse a, fluido de cultivo celular recolectado, de una agrupación en procedimiento en una determinada etapa de un procedimiento de purificación, o del producto purificado final.

Un "anticuerpo de captura" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana en una muestra. En determinadas condiciones, el anticuerpo de captura forma un complejo con la molécula diana de modo que el complejo anticuerpo-molécula diana se pueda separar del resto de la muestra. En determinados modos de realización, dicha separación puede incluir eliminar mediante lavado sustancias o materiales en la muestra que no se unieron al anticuerpo de captura. En determinados modos de realización, un anticuerpo de captura se puede unir a una superficie de soporte sólida, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse a, una placa o una microesfera.

Un "anticuerpo de detección" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana en una muestra o en un material de combinación de muestra-anticuerpo de captura. En determinadas condiciones, el anticuerpo de detección forma un complejo con la molécula diana o con un complejo de molécula diana-anticuerpo de captura. Un anticuerpo de detección se puede detectar directamente a través de un marcador, que se puede amplificar, o indirectamente, por ejemplo, a través del uso de otro anticuerpo que se marca y que se une al anticuerpo de detección. Para el marcado directo, el anticuerpo de detección se conjuga típicamente con un resto que es detectable por algún medio, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, biotina o rutenio.

Los términos "marcador" o "marcador detectable" se refieren a cualquier grupo químico o resto que se puede unir a una sustancia que se va a detectar o cuantificar, por ejemplo, un anticuerpo. Típicamente, un marcador es un marcador detectable que es adecuado para la detección o cuantificación sensible de una sustancia. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, marcadores luminiscentes, por ejemplo, marcadores fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y electroquimioluminiscentes, marcadores radiactivos, enzimas, partículas, sustancias magnéticas, especies electroactivas y similares. De forma alternativa, un marcador detectable puede señalar su presencia participando en reacciones de unión específicas. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen haptenos, anticuerpos, biotina, estreptavidina, etiqueta de his, ácido nitrilotriacético, glutatión S-transferasa, glutatión y similares.

El término "medios de detección" se refiere a un resto o técnica usado para detectar la presencia del anticuerpo detectable a través de la indicación de una señal que a continuación se lee en un ensayo. Típicamente, los medios de detección emplean reactivos que amplifican un marcador inmovilizado tal como el marcador capturado en una placa de microvaloración, por ejemplo, avidina o estreptavidina-HRP.

"Fotoluminiscencia" se refiere a un procedimiento mediante el cual un material se ilumina posteriormente a la absorción por ese material de luz (de forma alternativa denominada radiación electromagnética). La fluorescencia y la fosforescencia son dos tipos diferentes de fotoluminiscencia. Los procedimientos "quimioluminiscentes" implican la creación de especies luminiscentes mediante una reacción química. La "electroquimioluminiscencia" o "ECL" es un procedimiento con el que una especie, por ejemplo, un anticuerpo, se ilumina tras la exposición de esa especie a energía electroquímica en un entorno químico circundante apropiado.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, una proteína de una célula huésped, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como reactivo de ensayo, por ejemplo, como un anticuerpo de captura o como un anticuerpo de detección. Típicamente, dicho anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con otros polipéptidos.

Con respecto a la unión de un polipéptido a una molécula diana, el término "unión específica a" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular significa que la unión es diferente de forma mensurable de una interacción no específica. Se puede medir la unión específica, por ejemplo, determinando la unión de una molécula diana en comparación con la unión de una molécula de control, que, en general, es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. En algunos modos de realización, una preparación de anticuerpos policlonales se une específicamente a DsbA o DsbC. Por ejemplo, al menos aproximadamente un 99 % de los anticuerpos en la preparación de anticuerpo policlonal se unen al polipéptido deseado (por ejemplo, DsbA o DsbC).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de

una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar, en general, mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento.

"Activo" o "actividad" para los propósitos del presente documento hace referencia a la forma o formas de un polipéptido que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido natural, en el que actividad "biológica" hace referencia a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por un polipéptido natural que no sea la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido natural, y una actividad "inmunológica" hace referencia a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido natural. De forma similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido natural. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos naturales, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula candidata a agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos inalterados y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina naturales que tienen estructuras variables, todas basadas en el plegamiento de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras" que se unen mediante enlaces disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera comprende por sí misma una región "constante" (C) y una "variable" (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte y función estructurales en las interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunitarios. La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo de unirse específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se determina mediante las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente en el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables 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*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada región V comprende típicamente tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR", cada una de las cuales contiene un "bucle hipervariable") y cuatro regiones estructurales. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado particular, por lo tanto, incluirá típicamente las tres CDR y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones estructurales intercaladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos de cuatro cadenas clásicos tienen sitios de unión a antígeno que se definen por los dominios V_H y V_L en cooperación. Determinados anticuerpos, tales como los anticuerpos de camello y de tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en sitios de unión formados solo por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas genomanipuladas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre V_H y V_L .

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, en los dominios variables tanto de cadena ligera

como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables 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*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L , y alrededor de aproximadamente 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L , y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H (Chothia y Lesk. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Los residuos de la "región estructural" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

La "región bisagra" en el contexto de un anticuerpo o medio anticuerpo se define en general como el tramo desde Glu216 a Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C terminal a la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc. Antes de la presente invención, la unión de Fc γ R se atribuía en general a residuos de aminoácido en la región bisagra inferior de una región Fc de IgG.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde aproximadamente los residuos 231 a aproximadamente 340 de la IgG. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural inalterada. Se ha especulado que el hidrato de carbono puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985).

El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 a aproximadamente el residuo de aminoácido 447 de una IgG).

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo inalterado, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, patente de EE. UU n.º 5.641.870, ejemplo 2, Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8 (10):1057-1062 (1995)); anticuerpos de un brazo, anticuerpos de dominio variable único, minicuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)₄-Fc, di-scFv, bi-scFv o (di,tri)-scFv en tándem); y acopladores de linfocitos T biespecíficos (BiTE).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y todavía pueden reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico del dominio CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Conjuntamente, las seis

regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) puede reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab 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 residuos en el extremo carboxílico 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 el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos a clases diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos inalterados: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Se describen más completamente diacuerpos, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo multiespecífico" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H, uniéndose cada unidad V_HV_L a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos, uniéndose cada dominio variable único a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos trifuncionales, fragmentos de anticuerpos que se han unido covalentemente o no covalentemente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítipos diferentes en la(s) misma(s) o diferente(s) diana(s). "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unirse solo a un epítipo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítipo con una afinidad de 5 μM a 0,001 pM, de 3 μM a 0,001 pM, de 1 μM a 0,001 pM, de 0,5 μM a 0,001 pM o de 0,1 μM a 0,001 pM.

La expresión "anticuerpos de dominio único" (sdAb) o "anticuerpos de dominio variable único (SVD)" se refiere, en general, a anticuerpos en los que un dominio variable único (V_H o V_L) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, el dominio variable único no necesita interactuar con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de procedimientos recombinantes de anticuerpos humanos y de ratón (*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56; *Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235; *Trends Biotechnol* (2003):21:484-490; documento WO 2005/035572; documento WO 03/035694; *FEBS Lett* (1994) 339:285-290; documento WO00/29004; documento WO 02/051870).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando en general presentes dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítipos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el

antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de la región constante humanas (pat. de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por la(s) sustitución/sustituciones en FR como se indica anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véase 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).

Para los propósitos en el presente documento, un "anticuerpo inalterado" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo inalterado tiene una o más funciones efectoras.

Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de 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 se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un "anticuerpo no marcado" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no se conjuga a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con una especificidad de unión deseada, siendo la secuencia de aminoácidos distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga" en comparación con una región constante de un anticuerpo), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencia de CH2 y/o CH3 de una IgG). Las secuencias de adhesinas ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos contiguas que comprenden una parte de un receptor o un ligando que se une a una proteína de interés. Las secuencias de adhesinas también pueden ser secuencias que se unen a una proteína de interés, pero no son secuencias de

receptores o ligandos (por ejemplo, secuencias de adhesinas en peptidocitos). Dichas secuencias polipeptídicas se pueden seleccionar o identificar por diversos procedimientos, incluyen técnicas de presentación en fagos y procedimientos de clasificación de alto rendimiento. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

En algunos modos de realización, las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo)) que forma complejos con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción celular en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunos modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes los PBMC y los linfocitos NK.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

El término "impurezas" como se usa en el presente documento se refiere a materiales o sustancias que son diferentes del producto polipeptídico deseado. Las impurezas incluyen, sin limitación: materiales de la célula huésped, tal como proteína de una célula huésped de *E. coli* (ECP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componente de medios de cultivo celular, etc. En algunos ejemplos, la impureza puede ser una proteína de una célula huésped (HCP) de, por ejemplo, pero sin limitarse a, una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli* (por ejemplo, ECP). En

algunos modos de realización, la impureza puede ser DsbA o DsbC recortada y/o agregados de DsbA o DsbC.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. En determinados modos de realización, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, *Kuby Immunology*, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se une. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

El término "secuencial" como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía se refiere a que tiene una primera cromatografía seguida de una segunda cromatografía. Se pueden incluir etapas adicionales entre la primera cromatografía y la segunda cromatografía.

El término «continuo» como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía se refiere a que tiene un primer material de cromatografía y un segundo material de cromatografía bien directamente conectado o algún otro mecanismo que permite un flujo continuo entre los dos materiales de cromatografía.

"Densidad de carga" se refiere a la cantidad, por ejemplo, gramos, de composición puesta en contacto con un volumen de material de cromatografía, por ejemplo, litros. En algunos ejemplos, la densidad de carga se expresa en g/l.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se refieren a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en" aspectos y variaciones.

II. Procedimientos de purificación

En el presente documento se proporcionan procedimientos para generar preparaciones ultrapuras de DsbA y DsbC. En algunos modos de realización, las preparaciones comprenden más de aproximadamente cualquiera de un 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de DsbA o DsbC pura. En algunos modos de realización, una preparación que es un 99 % de DsbA pura o un 99 % de DsbC pura indica que menos de un 1 % del material en la preparación son sustancias presentes en las células o lisados celulares (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, *etc.*) presentes durante la producción de DsbA o DsbC. Una preparación pura al 99 % de DsbA o DsbC puede contener tampones, sales u otros excipientes usados en la purificación o formulación de DsbA o DsbC.

A. Purificación de DsbA

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para generar preparaciones ultrapuras de DsbA. En algunos modos de realización, la DsbA se produce por sobreexpresión de DsbA en un cultivo de fermentación bacteriana tal como un cultivo de *E. coli*. Después de la fermentación, se recogen y centrifugan las células bacterianas. La pasta de células resultante se resuspende en un tampón de lisis (por ejemplo, MOPS 10 mM, pH 7,1) y se lisa (por ejemplo, usando un microfluidizador). En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con polietilénimina (PEI). En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a una concentración final de más de aproximadamente cualquiera de un 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 %. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI durante más de aproximadamente cualquiera de 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h o 24 h. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a más de aproximadamente cualquiera de 0 °C, 4 °C o 21 °C. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a temperatura ambiente (~21 °C). En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se centrifuga para eliminar partículas. En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se filtra antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se filtra a través de un filtro de 22 µm antes de la cromatografía.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende procedimientos para purificar un polipéptido de DsbA a partir de un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA, comprendiendo el procedimiento a) añadir polietilénimina (PEI) a una concentración final de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1,0 % a un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA, b) clarificar el lisado celular por centrifugación, c) aplicar el lisado celular clarificado que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio aniónico, d) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio aniónico para generar un eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA, e) aplicar el eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio catiónico, f) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio catiónico para generar un eluido del intercambio catiónico que comprende el polipéptido de DsbA purificado.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una fase sólida que está cargada positivamente y tiene aniones libres para su intercambio con aniones en una solución acuosa que se hace pasar por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio aniónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En un modo de realización, el material de intercambio aniónico puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico puede comprender una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o un grupo funcional de ion amonio cuaternario, un grupo funcional poliamina o un grupo funcional dietilaminoetilo. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una membrana de cromatografía de intercambio aniónico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico es una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para su intercambio con cationes en una solución acuosa que se hace pasar por o a través de la fase sólida. En algunos modos de

realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico puede ser una resina. El material de intercambio catiónico puede comprender un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico tal como, pero sin limitarse a, sulfonato, carboxílico, ácido carboximetilsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo, carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo u ortofosfato. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una columna de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una membrana de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de la invención, el material de cromatografía no es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio iónico puede utilizar un material de cromatografía convencional o un material de cromatografía convectivo. Los materiales de cromatografía convencionales incluyen, por ejemplo, materiales perfusivos (por ejemplo, resina de poli(estireno-divinilbenceno)) y materiales difusivos (por ejemplo, resina de agarosa reticulada). En algunos modos de realización, la resina de poli(estireno-divinilbenceno) puede ser resina Poros. En algunos modos de realización, la resina de agarosa reticulada puede ser resina de sulfopropil-Sepharose® Fast Flow ("SPSFF"). El material de cromatografía convectivo puede ser una membrana (por ejemplo, polietersulfona) o un material monolítico (por ejemplo, polímero reticulado). La membrana de polietersulfona puede ser Mustang. El material monolítico de polímero reticulado puede ser poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno) reticulado.

Ejemplos de materiales de intercambio aniónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Poros HQ 50, Poros PI 50, Poros D, Mustang Q, Q Sepharose® FF (QSFF) y DEAE Sepharose® o equivalentes de los mismos. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico débil; por ejemplo, DEAE. En otros modos de realización, el material de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico fuerte; por ejemplo, QSFF.

Ejemplos de materiales de intercambio catiónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Mustang S, Sartobind S, SO3 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros XS, Poros HS50, Poros HS20, SPSFF, SP-Sepharose® XL (SPXL), CM Sepharose® Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel SO3, o Fractogel COO o equivalentes de los mismos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico es Poros HS50. En algunos modos de realización, la resina Poros HS puede ser partículas Poros HS de 50 µm o Poros HS de 20 µm. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico débil; por ejemplo, CM Sepharose® o equivalentes del mismo. En otros modos de realización, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico fuerte; por ejemplo, POROS HS 50 o equivalentes del mismo.

La carga de la composición que comprende DsbA sobre el material de cromatografía se puede optimizar para la separación del producto de DsbA de las impurezas. En algunos modos de realización, la carga en la composición sobre el material de cromatografía se optimiza para la unión de los contaminantes al material de cromatografía. Por ejemplo, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga a una serie de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de carga es constante. De forma alternativa, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía en un tampón de carga a una serie de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de carga es constante. Una vez completada la carga de la composición sobre el material de cromatografía y la elución del producto del material de cromatografía en una fracción de la agrupación, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información con respecto a la separación del producto de las impurezas para un pH o conductividad dado.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición que comprende DsbA se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del polipéptido de menos de o igual a aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml o 1 mg/ml del material de cromatografía de intercambio aniónico. La composición se puede cargar sobre un material de cromatografía aniónica a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 1 mg/ml y 2 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml, 3 mg/ml y 4 mg/ml, 4 mg/ml y 5 mg/ml, 5 mg/ml y 6 mg/ml, 6 mg/ml y 7 mg/ml, 7 mg/ml y 8 mg/ml, 8 mg/ml y 9 mg/ml ml, o 9 mg/ml y 10 mg/ml de material de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una amina cuaternaria reticulada a agarosa; por ejemplo, QSFF.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición que comprende DsbA se carga sobre un material de cromatografía de intercambio catiónico a una densidad de carga del polipéptido de menos de o igual a aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml o 1 mg/ml del material de cromatografía de intercambio aniónico. La composición se puede cargar sobre un material de cromatografía catiónica a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 1 mg/ml y 2 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml, 3 mg/ml y 4 mg/ml, 4 mg/ml y 5 mg/ml, 5 mg/ml y 6 mg/ml, 6 mg/ml y 7 mg/ml, 7 mg/ml y 8 mg/ml, 8 mg/ml y 9 mg/ml ml, o 9 mg/ml y 10 mg/ml de material de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio catiónico es un resto sulfopropilo reticulado a una matriz de poli(estireno-divinilbenceno);

por ejemplo, POROS HS50 o equivalentes del mismo.

La elución de la DsbA del material de cromatografía se puede optimizar para el rendimiento de DsbA con impurezas mínimas y con un volumen de agrupación mínimo. Por ejemplo, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga. Una vez completada la carga, el producto se eluye con tampones a una serie de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de elución es constante. De forma alternativa, el producto se puede eluir del material de cromatografía en un tampón de elución a una serie de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de elución es constante. Una vez completada la elución del producto a partir del material de cromatografía, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información con respecto a la separación del producto de las impurezas para un pH o conductividad dado. La elución del producto en un número alto de fracciones (por ejemplo, ocho volúmenes de columna) indica "prolongación" del perfil de elución. En algunos modos de realización de la invención, se minimiza la prolongación de la elución.

Se pueden emplear diversos tampones dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, la conductividad deseada del tampón, las características de la proteína de interés y el procedimiento de purificación. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden el uso de un tampón. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado o un tampón de lavado. En algunos modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son diferentes. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. El tampón de carga puede comprender cloruro de sodio, acetato de sodio o una mezcla de los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de acetato de sodio.

La carga, como se usa en el presente documento, es la composición cargada sobre un material de cromatografía. El tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición que comprende DsbA sobre un material de cromatografía. El material de cromatografía se puede equilibrar con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar. En algunos ejemplos, el tampón de lavado se usa después de cargar la composición sobre un material de cromatografía y antes de la elución del polipéptido de interés de la fase sólida.

La elución, como se usa en el presente documento, es la eliminación del producto, por ejemplo, DsbA, del material de cromatografía. El tampón de elución es el tampón usado para eluir el polipéptido u otro producto de interés de un material de cromatografía. En muchos casos, un tampón de elución tiene una característica física diferente del tampón de carga. Por ejemplo, el tampón de elución puede tener una conductividad diferente del tampón de carga o un pH diferente del tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más baja que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más alta que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH más bajo que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH más alto que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad diferente y un pH diferente que el tampón de carga. El tampón de elución puede tener cualquier combinación de conductividad más baja o más alta y pH más alto o más bajo.

Conductividad se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad en incremento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida básica para la conductividad es el siemensio (o mho), mho (mS/cm), y se puede medir usando un conductímetro, tal como diversos modelos de conductímetros Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una solución de transportar corriente eléctrica, se puede alterar la conductividad de una solución cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, se pueden alterar la concentración de un agente de tamponamiento y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución para lograr la conductividad deseada. Preferentemente, se modifica la concentración de sal de los diversos tampones para lograr la conductividad deseada.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene una conductividad superior a aproximadamente cualquiera de 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm o 10 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 4 mS/cm y 17 mS/cm, 4 mS/cm y 10 mS/cm, 4 mS/cm y 7 mS/cm, 5 mS/cm y 17 mS/cm, 5 mS/cm y 10 mS/cm o 5 mS/cm y 7 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad es de aproximadamente cualquiera de 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm o 10 mS/cm. En un aspecto, la conductividad es la conductividad del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, la conductividad de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y el tampón de lavado son las mismas. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de carga es diferente de la conductividad del tampón de lavado y/o del tampón de equilibrado.

- En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 5 mS/cm, 10 mS/cm, 15 mS/cm, 20 mS/cm, 25 mS/cm, 30 mS/cm, 35 mS/cm, 40 mS/cm, 45 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm o 100 mS/cm. En algunos modos de realización, los tampones de elución descritos anteriormente se usan en cromatografía de intercambio aniónico o de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución se altera alterando la concentración de sal del tampón de elución.
- En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución cambió del tampón de carga y/o de lavado de manera isocrática, por gradiente escalonado o por gradiente lineal.
- En algunos modos de realización, DsbA se eluye del material de cromatografía de intercambio aniónico con las siguientes etapas: 1) aproximadamente un 15 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 para aproximadamente cuatro volúmenes de columna, 2) aproximadamente un 20 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 para aproximadamente cuatro volúmenes de columna, y 3) aproximadamente un 25 % de Tris aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 9,2 hasta que la DsbA se eluya de la columna. En algunos modos de realización, DsbA se eluye de la cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente de sal de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 60 % de MES 12 mM y NaCl 1 M sobre 15 volúmenes de columna.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de intercambio aniónico tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 10, 9, 8, 7, 6 o 5. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.
- En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2. El pH del tampón de elución puede estar entre aproximadamente cualquiera de 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 4 y 6, 4 y 5, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6, 6 y 9, 6 y 8, 6 y 7. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente cualquiera de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de intercambio catiónico tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6 o 7. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6 o 7. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.
- En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 5, 6, 7, 8 o 9. El pH del tampón de elución puede estar entre aproximadamente cualquiera de 4 y 9, 5 y 9, 6 y 9, 7 y 9, 8 y 9, 4 y 8, 5 y 8, 6 y 8, 7 y 8, 4 y 7, 5 y 7, y 6 y 7.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menor que aproximadamente cualquiera de 50 VC/h, 40 VC/h o 30 VC/h. El caudal puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 5 VC/h y 50 VC/h, 10 VC/h y 40 VC/h o 18 VC/h y 36 VC/h. En algunos modos de realización, el caudal es de aproximadamente cualquiera de 9 VC/h, 18 VC/h, 25 VC/h, 30 VC/h, 36 VC/h o 40 VC/h. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menor que aproximadamente cualquiera de 200 cm/h, 150 cm/h, 100 cm/h, 75 cm/h o 50 cm/h. El caudal puede estar entre aproximadamente cualquiera de 25 cm/h y 200 cm/h, 25 cm/h y 175 cm/h, 25 cm/h y 150 cm/h, 25 cm/h y 100 cm/h, 50 cm/h y 100 cm/h o 65 cm/h y 85 cm/h.
- La altura de lecho es la altura del material de cromatografía usado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la altura del lecho es mayor que aproximadamente cualquiera de 3 cm, 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm, 30 cm, 35 cm, 40 cm, 45 cm o 50 cm. La altura del lecho puede estar entre aproximadamente cualquiera de 3 cm y 50 cm, 5 cm y 35 cm, 3 cm y 35 cm, o 5 cm y 50 cm. En algunos modos de realización, la altura del lecho se determina en base a la cantidad de polipéptido o impurezas en la carga.
- En algunos modos de realización, la cromatografía está en una columna de recipiente con un volumen mayor que aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml o 200 ml.

En algunos modos de realización de la invención, las fracciones se recogen de la cromatografía. En algunos modos de realización, las fracciones recogidas son mayores que aproximadamente 0,01 VC, 0,02 VC, 0,03 VC, 0,04 VC, 0,05 VC, 0,06 VC, 0,07 VC, 0,08 VC, 0,09 VC, 0,1 VC, 0,2 VC, 0,3 VC, 0,4 VC, 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 2,0 VC, 3,0 VC, 4,0 VC, 5,0 VC, 6,0 VC, 7,0 VC, 8,0 VC, 9,0 VC o 10,0 VC. En algunos modos de realización se agrupan fracciones que contienen el producto, por ejemplo, polipéptido. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que contienen el polipéptido de las fracciones de carga y de las fracciones de elución. La cantidad de polipéptido en una fracción se puede ser determinar por un experto en la técnica; por ejemplo, la cantidad de polipéptido en una fracción se puede determinar por espectroscopia UV. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que contienen fragmento de polipéptido detectable. En algunas modos de realización, la presencia y pureza de DsbA en una fracción se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Modo de realización ejemplar

En algunos modos de realización, la invención proporciona los siguientes procedimientos ejemplares pero no limitantes para producir una preparación ultrapura de DsbA. Se expresa DsbA en *E. coli*. Se suspende la pasta de células (50 g de pasta de células/1 l) en MOPS 10 mM pH 7,1 y se mezcla hasta que la suspensión es homogénea. Se realiza la lisis celular usando un microfluidificador 110F con 3 pases a presión doméstica (~7000 psi). Se acondiciona el homogeneizado a PEI al 0,1 % (usando una solución madre de PEI al 10 %) y se mezcla durante 30 min a temperatura ambiente (~21 °C). Se centrifuga la suspensión en una centrífuga Sorval RC-5B+ usando un rotor "GSA" a 8500 rpm durante 30 min. Se recoge el concentrado y se filtra a través de un filtro Durapore de 0,22 µm.

(a) Etapa con Q-Sepharose®

Se aplica el lisado celular a una Q-Sepharose® FF (GE) en modo de unión y elución. La altura de la columna es de aproximadamente 20-30 cm de altura, el caudal es de 150 cm/h y la densidad de carga es ≤6 mg/ml. Se preequilibra la columna con Tris 25 mM, NaCl 1 M, pH 9,2, 86 mS/cm con 4 volúmenes de columna (VC). Se equilibra la columna con Tris 25 mM, pH 9,1, 0,3 mS/cm con 4 VC. Se diluye con agua el concentrado que comprende DsbA (1:1), a continuación se ajusta el pH a 9,0 con Tris Base 1.5 M pH 9,0, conductividad ~1,0 mS/cm, ≤6 mg/ml. A continuación, se lava la columna con 6 VC de tampón de equilibrado. Se eluye DsbA de la columna usando un incremento con gradiente escalonado en la concentración de sal. El tampón B es Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 9,2, 26 mS/cm. Se eluye DsbA de la columna aplicando en primer lugar tampón B al 15 % 4 VC, a continuación tampón B al 20 % para 4 VC y finalmente tampón B al 25 % para el resto de la fase de elución. Se someten a ensayo las agrupaciones por SEC y se agrupan en base a las fracciones que contienen la mayor cantidad de DsbA.

(b) Etapa con POROS HS50

A continuación, se aplica la fracción de QSFF agrupada a una columna POROS HS50 en modo de unión y elución. Se ajusta la fracción de QSFF a pH 5,0 con ácido acético 2,0 M. La altura de la columna es de aproximadamente 20-30 cm, el caudal es de aproximadamente 150 cm/h, y la densidad de carga es de aproximadamente ≤6 mg/ml. Se equilibra en primer lugar la columna POROS HS50 con MES 12,5 mM, pH 5,5, 0,4 mS/cm para 4 VC. Se carga la agrupación de QSFF a pH ajustado a 5,0 con ácido acético 2 M, y a continuación diluido con agua (1:2) pH 5,0, 0,4 mS/cm, en la columna POROS HS50. A continuación, se lava la columna con 5 VC de tampón de equilibrado. Se eluye la DsbA de la columna con un gradiente de sal. El tampón B es MES 12,5 mM, NaCl 250 mM, pH 5,5, 25 mS/cm. El gradiente es de un 0 a un 60 % de B sobre 15 VC. Las fracciones de 1 VC son picos recogidos. Se analizan las fracciones y se agrupan en base a la pureza mediante gel en SDS-PAGE y SEC. La agrupación de POROS se concentra a ~3,0 mg/ml usando membranas Centricon (Millipore) de 10 kD que se centrifugan durante ~30 min a 3000 rpm con la centrífuga Sorval RC-3B.

B. Purificación de DsbC

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para generar preparaciones ultrapuras de DsbC. En algunos modos de realización, la DsbC se produce por sobreexpresión de DsbC en un cultivo de fermentación bacteriana tal como un cultivo de *E. coli*. Después de la fermentación, se recogen y centrifugan las células bacterianas. La pasta de células resultante se resuspende en un tampón de lisis (por ejemplo, MOPS 10 mM, pH 7,1) y se lisa (por ejemplo, usando un microfluidizador). En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con polietilenimina (PEI). En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a una concentración final de más de aproximadamente cualquiera de un 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 %. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI durante más de aproximadamente cualquiera de 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h o 24 h. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a más de aproximadamente cualquiera de 0 °C, 4 °C o 21 °C. En algunos modos de realización, el lisado celular se acondiciona con PEI a temperatura ambiente (~21 °C). En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se centrifuga para eliminar partículas. En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se filtra antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado acondicionado con PEI se filtra a través de un filtro de 22 µm antes de la cromatografía.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende procedimientos para purificar un polipéptido de DsbC a partir de un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbC, comprendiendo el procedimiento a) añadir polietilenimina (PEI) a una concentración final de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 1,0 % a un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbC, b) clarificar el lisado celular por centrifugación, c) aplicar el lisado celular clarificado que comprende el polipéptido de DsbC a un material de cromatografía de intercambio aniónico, d) eluir el polipéptido de DsbC del material de cromatografía de intercambio aniónico para generar un eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbC, e) aplicar el eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbC a un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), f) eluir el polipéptido de DsbC del material de HIC para generar un eluido de la HIC, g) aplicar el eluido de la HIC que comprende el polipéptido de DsbC a una cromatografía de exclusión por tamaño, h) recoger fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño que comprende el polipéptido de DsbC purificada.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una fase sólida que está cargada positivamente y tiene aniones libres para su intercambio con aniones en una solución acuosa que se hace pasar por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio aniónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En un modo de realización, el material de intercambio aniónico puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico puede comprender una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o un grupo funcional de ion amonio cuaternario, un grupo funcional poliamina o un grupo funcional dietilaminoetilo. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una membrana de cromatografía de intercambio aniónico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio aniónico puede utilizar un material de cromatografía convencional o un material de cromatografía convectiva. Los materiales de cromatografía convencionales incluyen, por ejemplo, materiales perfusivos (por ejemplo, resina de poli(estireno-divinilbenceno)) y materiales difusivos (por ejemplo, resina de agarosa reticulada). En algunos modos de realización, la resina de poli(estireno-divinilbenceno) puede ser resina Poros. En algunos modos de realización, la resina de agarosa reticulada puede ser resina de sulfopropil-Sepharose® Fast Flow ("SPSFF"). El material de cromatografía convectivo puede ser una membrana (por ejemplo, polietersulfona) o un material monolítico (por ejemplo, polímero reticulado). La membrana de polietersulfona puede ser Mustang. El material monolítico de polímero reticulado puede ser poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno) reticulado.

Ejemplos de materiales de intercambio aniónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Poros HQ 50, Poros PI 50, Poros D, Mustang Q, Q Sepharose® FF (QSFF) y DEAE Sepharose® o equivalentes de los mismos. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico débil; por ejemplo, DEAE. En otros modos de realización, el material de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico fuerte; por ejemplo, QSFF. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico usado para la purificación de DsbC es un material de intercambio aniónico débil. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico débil comprende una amina cuaternaria. En algunos modos de realización, la amina cuaternaria está unida a agarosa reticulada. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico usado para la purificación de DsbC es DEAE Sepharose®.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una técnica de cromatografía de líquidos que separa las biomoléculas de acuerdo con la hidrofobia. Ejemplos de materiales de cromatografía HIC incluyen, pero no se limitan a, Toyopearl hexilo 650, Toyopearl butilo 650, Toyopearl fenilo 650, Toyopearl éter 650, Source, Resource, Sepharose® Hi-Trap, Octil sepharose®, fenil sepharose®. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de HIC es una columna de cromatografía HIC. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de HIC es una membrana de cromatografía HIC. En algunos modos de realización el material de HIC comprende un resto fenilo. En algunos modos de realización, el resto fenilo está unido a agarosa reticulada. En algunos modos de realización, el material de HIC usado para la purificación de DsbC es fenil Sepharose®.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica de cromatografía de líquidos que separa biomoléculas de acuerdo con su tamaño y forma. Los materiales de cromatografía de exclusión por tamaño vienen en diferentes tamaños de poro para una separación eficaz de moléculas de intervalos de peso particulares. Los ejemplos de materiales de cromatografía de exclusión por tamaño incluyen, pero no se limitan a, dextrano, partículas de agarosa porosas, agarosa reticulada, agarosa y dextrano reticulados, y acrilamida reticulada. Los ejemplos de materiales de cromatografía de exclusión por tamaño incluyen, pero no se limitan a, Sephadex, Superdex, Sephacryl, TSKgel y Bio-Gel. En algunos modos de realización, se usa cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex 75 en la purificación de DsbC.

La carga de la composición que comprende DsbC sobre el material de cromatografía se puede optimizar para la separación del producto de DsbC de las impurezas. En algunos modos de realización, la carga en la composición

sobre el material de cromatografía se optimiza para la unión de los contaminantes al material de cromatografía. Por ejemplo, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga a una serie de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de carga es constante. De forma alternativa, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía en un tampón de carga a una serie de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de carga es constante. Una vez completada la carga de la composición sobre el material de cromatografía y la elución del producto del material de cromatografía en una fracción de la agrupación, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información con respecto a la separación del producto de las impurezas para un pH o conductividad dado.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición que comprende DsbC se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del polipéptido de menos de o igual a aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml o 1 mg/ml del material de cromatografía de intercambio aniónico. La composición se puede cargar sobre un material de cromatografía aniónica a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 1 mg/ml y 2 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml, 3 mg/ml y 4 mg/ml, 4 mg/ml y 5 mg/ml, 5 mg/ml y 6 mg/ml, 6 mg/ml y 7 mg/ml, 7 mg/ml y 8 mg/ml, 8 mg/ml y 9 mg/ml ml, o 9 mg/ml y 10 mg/ml de material de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una amina cuaternaria reticulada a agarosa; por ejemplo, DEAE Sepharose®.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición que comprende DsbC se carga sobre un material de HIC a una densidad de carga del polipéptido de menos de o igual a aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml o 1 mg/ml del material de HIC. La composición se puede cargar sobre un material de HIC a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 1 mg/ml y 2 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml, 3 mg/ml y 4 mg/ml, 4 mg/ml y 5 mg/ml, 5 mg/ml y 6 mg/ml, 6 mg/ml y 7 mg/ml, 7 mg/ml y 8 mg/ml, 8 mg/ml y 9 mg/ml ml, o 9 mg/ml y 10 mg/ml de material de HIC. En algunas realizaciones, el material de HIC es un resto fenilo reticulado a agarosa reticulada; por ejemplo, fenil Sepharose®.

La elución de la DsbC del material de cromatografía se puede optimizar para el rendimiento de DsbC con impurezas mínimas y con un volumen de agrupación mínimo. Por ejemplo, la composición se puede cargar sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga. Una vez completada la carga, el producto se eluye con tampones a una serie de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de elución es constante. De forma alternativa, el producto se puede eluir del material de cromatografía en un tampón de elución a una serie de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de elución es constante. Una vez completada la elución del producto a partir del material de cromatografía, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información con respecto a la separación del producto de las impurezas para un pH o conductividad dado. La elución del producto en un número alto de fracciones (por ejemplo, ocho volúmenes de columna) indica "prolongación" del perfil de elución. En algunos modos de realización de la invención, se minimiza la prolongación de la elución.

Se pueden emplear diversos tampones dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, la conductividad deseada del tampón, las características de la proteína de interés y el procedimiento de purificación. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden el uso de un tampón. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado o un tampón de lavado. En algunos modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son diferentes. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. El tampón de carga puede comprender cloruro de sodio, acetato de sodio o una mezcla de los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de acetato de sodio.

La carga, como se usa en el presente documento, es la composición cargada sobre un material de cromatografía. El tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición que comprende DsbC sobre un material de cromatografía. El material de cromatografía se puede equilibrar con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar. En algunos ejemplos, el tampón de lavado se usa después de cargar la composición sobre un material de cromatografía y antes de la elución del polipéptido de interés de la fase sólida.

La elución, como se usa en el presente documento, es la eliminación del producto, por ejemplo, DsbC, del material de cromatografía. El tampón de elución es el tampón usado para eluir el polipéptido u otro producto de interés de un material de cromatografía. En muchos casos, un tampón de elución tiene una característica física diferente del tampón de carga. Por ejemplo, el tampón de elución puede tener una conductividad diferente del tampón de carga o un pH diferente del tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más baja que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más alta que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH más bajo que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH más alto que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad diferente y un pH diferente que el tampón

de carga. El tampón de elución puede tener cualquier combinación de conductividad más baja o más alta y pH más alto o más bajo.

Conductividad se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad en incremento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida básica para la conductividad es el siemensio (o mho), mho (mS/cm), y se puede medir usando un conductímetro, tal como diversos modelos de conductímetros Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una solución de transportar corriente eléctrica, se puede alterar la conductividad de una solución cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, se pueden alterar la concentración de un agente tamponante y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución para lograr la conductividad deseada. Preferentemente, se modifica la concentración de sal de los diversos tampones para lograr la conductividad deseada.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de intercambio aniónico tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm o 10 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 4 mS/cm y 17 mS/cm, 4 mS/cm y 10 mS/cm, 4 mS/cm y 7 mS/cm, 5 mS/cm y 17 mS/cm, 5 mS/cm y 10 mS/cm o 5 mS/cm y 7 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad es de aproximadamente cualquiera de 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm o 10 mS/cm. En un aspecto, la conductividad es la conductividad del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, la conductividad de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y el tampón de lavado son las mismas. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de carga es diferente de la conductividad del tampón de lavado y/o del tampón de equilibrado.

En algunos modos de realización, el tampón de elución de intercambio aniónico tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 5 mS/cm, 10 mS/cm, 15 mS/cm, 20 mS/cm, 25 mS/cm, 30 mS/cm, 35 mS/cm, 40 mS/cm, 45 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm o 100 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución se altera alterando la concentración de sal del tampón de elución.

En algunos modos de realización, el tampón de carga de HIC tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de elución. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de HIC tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 5 mS/cm, 10 mS/cm, 15 mS/cm, 20 mS/cm, 25 mS/cm, 30 mS/cm, 35 mS/cm, 40 mS/cm, 45 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm o 100 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución se altera alterando la concentración de sal del tampón de elución.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución de HIC tiene una conductividad menor que aproximadamente cualquiera de 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm o 10 mS/cm.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución cambió del tampón de carga y/o de lavado de manera isocrática, por gradiente escalonado o por gradiente lineal.

En algunos modos de realización, DsbC se eluye del material de cromatografía de intercambio aniónico con un gradiente de sal de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 60 % de MOPS 10 mM y NaCl 250 mM sobre 15 volúmenes de columna. En algunos modos de realización, el gradiente de sal es de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 60 % de MOPS 10 mM y NaCl 250 M sobre 10 volúmenes de columna.

En algunos modos de realización, DsbC se eluye del material de HIC usando agua purificada hasta que DsbC se eluye del material de HIC.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de intercambio aniónico tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 10, 9, 8, 7, 6 o 5. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.

En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2. El pH del tampón de elución puede estar entre aproximadamente cualquiera de 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 4 y 6, 4 y 5, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6, 6 y 9, 6 y 8, 6 y 7. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente cualquiera de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0. En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbC se carga sobre el material de intercambio aniónico en el tampón de carga a pH 8 y se eluye del material de intercambio aniónico en el tampón de elución a pH aproximadamente 7,0 o 7,1.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga de HIC tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 6, 7 u 8. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 6, 7 u 8. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.

En algunos modos de realización, la cromatografía de exclusión por tamaño se usa en un modo de flujo continuo. En algunos modos de realización, el tampón usado para la cromatografía de exclusión por tamaño es PBS pH 7,0 $\pm$ 0,4.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menor que aproximadamente cualquiera de 50 VC/h, 40 VC/h o 30 VC/h. El caudal puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 5 VC/h y 50 VC/h, 10 VC/h y 40 VC/h o 18 VC/h y 36 VC/h. En algunos modos de realización, el caudal es de aproximadamente cualquiera de 9 VC/h, 18 VC/h, 25 VC/h, 30 VC/h, 36 VC/h o 40 VC/h. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menor que aproximadamente cualquiera de 200 cm/h, 150 cm/h, 100 cm/h, 75 cm/h o 50 cm/h. El caudal puede estar entre aproximadamente cualquiera de 25 cm/h y 200 cm/h, 25 cm/h y 175 cm/h, 25 cm/h y 150 cm/h, 25 cm/h y 100 cm/h, 50 cm/h y 100 cm/h o 65 cm/h y 85 cm/h. En algunas realizaciones, el caudal es aproximadamente mayor que aproximadamente 0,1 ml/min, 0,25 ml/min, 0,5 ml/min, 0,75 ml/min, 1 ml/min, 2 ml/min, 3 ml/min, 4 ml/min. min, 5 ml/min, 6 ml/min, 7 ml/min, 8 ml/min, 9 ml/min, 10 ml/min, 11 ml/min, 12 ml/min, 13 ml/min, 14 ml/min, 15 ml/min, 20 ml/min, 25 ml/min y 50 ml/min. En algunos modos de realización, el caudal está entre aproximadamente 0,1 ml/min y 1 ml/min, 1 ml/min y 5 ml/min, 1 ml/min y 10 ml/min, 5 ml/min y 10 ml/min, 10 ml/min y 15 ml/min, 10 ml/min y 25 ml/min, y 15 ml/min y 25 ml/min. En algunos modos de realización, el caudal para la cromatografía de intercambio aniónico de DsbC es de aproximadamente 13,3 ml/min. En algunos modos de realización, el caudal para la cromatografía de interacción hidrófoba de DsbC es de aproximadamente 13,2 ml/min. En algunos modos de realización, el caudal para la cromatografía de exclusión por tamaño de DsbC es de aproximadamente 1 ml/min.

La altura de lecho es la altura del material de cromatografía usado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la altura del lecho es mayor que aproximadamente cualquiera de 3 cm, 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm, 30 cm, 35 cm, 40 cm, 45 cm, 50 cm, 60 cm, 70 cm, 80 cm, 90 cm o 100 cm. La altura del lecho puede estar entre aproximadamente cualquiera de 3 cm y 50 cm, 5 cm y 35 cm, 3 cm y 35 cm, o 5 cm y 50 cm. En algunos modos de realización, la altura del lecho se determina en base a la cantidad de polipéptido o impurezas en la carga.

En algunos modos de realización, la cromatografía está en una columna de recipiente con un volumen mayor que aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml o 200 ml.

En algunos modos de realización de la divulgación, se recogen fracciones de la cromatografía. En algunos modos de realización, las fracciones recogidas son mayores que aproximadamente 0,01 VC, 0,02 VC, 0,03 VC, 0,04 VC, 0,05 VC, 0,06 VC, 0,07 VC, 0,08 VC, 0,09 VC, 0,1 VC, 0,2 VC, 0,3 VC, 0,4 VC, 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 2,0 VC, 3,0 VC, 4,0 VC, 5,0 VC, 6,0 VC, 7,0 VC, 8,0 VC, 9,0 VC o 10,0 VC. En algunos modos de realización se agrupan fracciones que contienen el producto, por ejemplo, polipéptido. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que contienen el polipéptido de las fracciones de carga y de las fracciones de elución. La cantidad de polipéptido en una fracción se puede ser determinar por un experto en la técnica; por ejemplo, la cantidad de polipéptido en una fracción se puede determinar por espectroscopia UV. En algunos modos de realización, se agrupan fracciones que contienen fragmento de polipéptido detectable. En algunas modos de realización, la presencia y pureza de DsbC en una fracción se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Modo de realización ejemplar

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona el siguiente procedimiento ejemplar pero no limitante para producir una preparación ultrapura de DsbC. Se expresa DsbC en *E. coli*. Se suspende la pasta de células (50 g de pasta de células/1 l) en MOPS 10 mM pH 7,1 y se mezcla hasta que la suspensión es homogénea. Se realiza la lisis celular usando un microfluidificador 110F con 3 pasas a presión doméstica (~7000 psi). Se acondiciona el homogeneizado a PEI al 0,1 % (usando una solución madre de PEI al 10 %) y se mezcla durante 30 min a temperatura

ambiente (~21 °C). Se centrifuga la suspensión en una centrífuga Sorval RC-5B+ usando un rotor "GSA" a 8500 rpm durante 30 min. Se recoge el concentrado y se filtra a través de un filtro Durapore de 0,22 µm.

(a) DEAE Sepharose

Se carga el concentrado clarificado (acondicionado con Tris base 1,5 M a pH 8,0) en una columna que contiene DEAE Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) en modo de unión y elución. La columna tiene las siguientes propiedades: la columna tenía 28,4 cm × 2,6 cm de diámetro, volumen 151 ml, capacidad de proteína ≤50 mg/ml de resina. Se preequilibra la columna con 3 VC de MOPS 250 mM, pH 7,1; cond. 6,2 mS/cm y se equilibra con MOPS 10 mM, pH 7,1; cond. 0,3 mS/cm. Al final de la carga, se lava la columna con 12 VC de tampón de equilibrado. Se eluye el DsbC usando un gradiente de 15 VC de tampón B al 0 - 60 %. La elución es un gradiente lineal de tampón B al 0-60 % en tampón de elución sobre 15 VC. Se analizan las fracciones por SDS-PAGE.

(b) Fenil Sepharose

A continuación, se aplican las fracciones de DEAE agrupadas a cromatografía con Fenil Sepharose® en modo de unión y elución. La columna tiene las siguientes propiedades: la columna tenía 20 cm × 2,6 cm de diámetro, volumen 106 ml, capacidad de proteína ≤20 mg/ml de resina. Se equilibra la columna con sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Se carga la agrupación de DEAE acondicionado que comprende DsbC sobre la columna de fenil Sepharose después de una dilución de 1:1 con sulfato de sodio 1,2 M, 1:20 con fosfato de sodio 1 M y ajustada a pH 7,0, ~68 mS/cm antes de la carga. A continuación, se lava la columna con 7 VC de sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 y a continuación con 7 VC de sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Se eluye DsbC de la columna con agua purificada. Se recogen las fracciones y se analizan mediante análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la columna.

(c) Superdex

A continuación, las fracciones agrupadas de fenil Sepharose se someten a cromatografía de exclusión por tamaño, usando Superdex 75. Esta etapa se usa para eliminar cualquier especie residual de alto PM y bajo PM, y para formular la DsbC. Superdex 75 tiene un intervalo de fraccionamiento (5 kDa a 70 kDa) se adapta mejor a una proteína más pequeña (~24 kDa) como DsbC. La columna es una Superdex 75 y tiene las siguientes propiedades: la columna tenía 60 cm × 2,6 cm de diámetro, volumen 320 ml, volumen de carga ≤16 ml. Se concentró la agrupación de HIC (fracciones 7-11) se concentra a un volumen de ≤ 16 ml (≤ 5 % del VC de SEC) usando filtros centrífugos. Se centrifugan las unidades a 4000 rpm usando una centrífuga clínica durante intervalos de 20 min hasta que se alcanza el volumen objetivo. Se equilibra la columna de exclusión de tamaño Superdex 75 con 3 VC de PBS, pH 7,0 ± 0,4. Se carga La fracción de fenil sepharose en la columna y se eluye con PBS, pH 7,0 ± 0,4 a un caudal de 1 ml/min.

C. Procedimientos para determinar la pureza de DsbA y DsbC

Los procedimientos para determinar la pureza de las preparaciones de DsbA y DsbC son conocidos en la técnica. En algunos modos de realización, la pureza de DsbA o DsbC en una preparación se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En algunos modos de realización, la pureza de DsbA o DsbC en una preparación se determina mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento por cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC SEC). En algunos modos de realización, la pureza de DsbA o DsbC en una preparación se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). En algunos modos de realización, la proteína en un gel SDS PAGE se identifica usando una tinción con proteína fluorescente. En algunos modos de realización, la tinción con proteína fluorescente es una tinción Sypro®Ruby. En algunos modos de realización, las proteínas en la SDS-PAGE se visualizan usando tinción con plata de Heukeshoven. En otros modos de realización, la identidad de la molécula de DsbA o DsbC se confirma usando ensayos de caracterización que incluyen, pero sin limitarse a, análisis de secuencia N-terminal, huella peptídica (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF), masa inalterada/reducida por CHIP TOF y análisis por inmunoelectrotransferencias.

En algunos modos de realización, la invención proporciona preparaciones ultrapuras de DsbA. En algunos modos de realización, la invención proporciona una preparación de DsbA en la que la DsbA monomérica constituye al menos aproximadamente cualquiera de un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de la preparación. En algún modo de realización, la DsbA monomérica es aproximadamente cualquiera de un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y/o 99,5 % de la preparación. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de impurezas. Las impurezas pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de una célula huésped tales como proteínas de una célula huésped de *E. coli*, ácidos nucleicos, virus, componentes de cultivo celular tales como componentes de medios de cultivo celular, así como agregados de DsbA o fragmentos de DsbA (por ejemplo, fragmentos no funcionales de DsbA). En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 2 %, 1,5 % o 1 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente un 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de alto peso molecular. En algunos modos de realización, las especies de alto peso molecular son indetectables. En algunos modos de realización, la presencia de DsbA monomérica, especies de bajo peso molecular y/o especies de

alto peso molecular se detectan por SEC.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona preparaciones ultrapuras de DsbC. En algunos modos de realización, la divulgación proporciona una preparación de DsbC en la que la DsbC monomérica constituye al menos aproximadamente cualquiera de un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de la preparación. En algún modo de realización, la DsbC monomérica es aproximadamente cualquiera de un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y/o 99,5 % de la preparación. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de impurezas. Las impurezas pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de una célula huésped tales como proteínas de una célula huésped de *E. coli*, ácidos nucleicos, virus, componentes de cultivo celular tales como componentes de medios de cultivo celular, así como agregados de DsbC o fragmentos de DsbC (por ejemplo, fragmentos no funcionales de DsbC). En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente un 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de alto peso molecular. En algunos modos de realización, la presencia de DsbC monomérica, especies de bajo peso molecular y/o especies de alto peso molecular se detectan por SEC.

Son conocidos en la técnica procedimientos de medición del ADN, tales como el ADN de la célula huésped, y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de ADN se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de CHOP se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % u 85 % y 99 %. La cantidad de ADN se puede reducir en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de ADN en la composición recuperada de una(s) etapa(s) de purificación con la cantidad de ADN en la composición antes de la(s) etapa(s) de purificación.

Componente de medio de cultivo celular se refiere a un componente presente en un medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular puede ser un medio de cultivo celular en el momento de la recolección de células. En algunos modos de realización, el componente de medio de cultivo celular es gentamicina. La cantidad de gentamicina se puede medir mediante ELISA. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de componente de medio de cultivo celular se puede reducir en entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, u 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición recuperada de una(s) etapa(s) de purificación con la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición antes de la(s) etapa(s) de purificación.

III. Polipéptidos-DsbA y DsbC

La invención proporciona procedimientos para generar preparaciones ultrapuras de DsbA y la divulgación proporciona procedimientos para generar preparaciones ultrapuras de DsbC. El término proteínas "Dsb" se refiere a disulfuro oxidoreductasas bacterianas. La DsbA forma enlaces disulfuro intracatenarios a medida que emergen péptidos en el periplasma de la célula y la DsbC sirve como un enlace disulfuro isomerasa durante el plegamiento oxidativo de la proteína en el periplasma de la célula. En algunos modos de realización, DsbA y DsbC se derivan de bacterias. En algunos modos de realización, los polipéptidos de DsbA y DsbC son polipéptidos de DsbA y DsbC de *E. coli*. En otros modos de realización, los polipéptidos de DsbA y DsbC se derivan de cualquier especie de *Enterobacteria*, *Actinobacter*, *Azoarcus*, *Salmonella*, *Buchnera*, *Xylella*, *Xanthomonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Erwinia* y *Neisseria*. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente cualquiera de un 70 %, un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, el polipéptido de DsbC comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente cualquiera de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

Los polipéptidos de DsbA y DsbC que se van a purificar usando los procedimientos descritos en el presente documento se producen en general usando técnicas recombinantes. Son conocidos en la técnica procedimientos para producir polipéptidos recombinantes en bacterias. Cuando se usan técnicas recombinantes, los polipéptidos se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o segregados directamente al medio. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica DsbA o DsbC se introduce en la célula huésped para la sobreexpresión del polipéptido. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica DsbA o DsbC se expresa a partir de un vector de expresión; por ejemplo, un plásmido. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de DsbA comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, el ácido

nucleico que codifica DsbA comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente cualquiera de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica DsbC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica DsbC comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente cualquiera de un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3.

Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Las células empleadas en la expresión de los polipéptidos se pueden romper por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes de lisis celular. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o bien fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar polipéptidos que se segregan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células 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 el polipéptido se segrega al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en primer lugar se concentran, en general, usando un filtro de concentración de polipéptidos disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la 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 casuales.

IV. Polipéptidos para los que se pueden usar DsbA y/o DsbC en la producción.

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden producir en bacterias (por ejemplo, *E. coli*) donde el plegamiento y ensamblaje de proteínas se pueden ver favorecidos por la sobreexpresión de DsbA y/o DsbC incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, inmunoadhesinas, anticuerpos, enzimas, hormonas, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas e interleucinas. Los ejemplos de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulación tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno de orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada por activación, normalmente expresada y segregada por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; hormona antimuleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una enzima; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor crecimiento de nervios tal como ngF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento (IGFBP); una citocina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; un polipéptido de fusión, es decir, un polipéptido compuesto por dos o más polipéptidos heterólogos o fragmentos de los mismos y codificado por un ácido nucleico recombinante; un polipéptido que contiene Fc, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina, o fragmento de la misma, fusionada a un segundo polipéptido; un inmunoconjugado; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura de SIDA; proteínas de transporte; receptores de la migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a un tumor tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2, HER3 o HER4; inmunoadhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a una proteína, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente.

En algunos modos de realización, la preparación de polipéptidos para su uso en cualquiera de los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento contiene un anticuerpo de interés, es decir, el polipéptido recombinante producido por una célula huésped es un anticuerpo.

Las dianas moleculares para dichos anticuerpos incluyen las proteínas CD y sus ligandos, tales como, pero sin limitarse a: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79? (CD79a) y CD79? (CD79b); (ii)

miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; (iii) moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha v/\beta 3$, incluyendo las subunidades alfa o bien beta de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); (iv) factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, factor tisular, $\beta 7$, etc.; y (v) antígenos asociados a tumor (TAA) de superficie celular y transmembranarios, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

Otros anticuerpos ejemplares incluyen los seleccionados de, y sin limitación, anticuerpo antirreceptor de estrógenos, anticuerpo antirreceptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-HER-2/neu, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anticatapsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anticadherina E, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo antiglicoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo antiproteína de retinoblastoma, anticuerpo antioncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo antiubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anticitoqueratinas, anticuerpo antivimentinas, anticuerpo antiproteínas del HPV, anticuerpo anticadenas ligeras kappa, anticuerpo anticadenas ligeras lambda, anticuerpo antimelanosomas, anticuerpo antiantígeno específico de próstata, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo antiantígeno tau, anticuerpo antifibrina, anticuerpo antikeratinas y anticuerpo antiantígeno Tn.

Anticuerpos policlonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se obtienen preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con un polipéptido que sea inmunógeno en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster sulfosuccinimida de maleimidobenzoilo (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg del polipéptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del valor. En algunos modos de realización, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con un polipéptido diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden elaborar en cultivo celular recombinante como fusiones polipeptídicas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación, tal como el alumbre, para mejorar la respuesta inmunitaria.

Anticuerpos monoclonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que surjan durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza como se describe en el presente documento para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. De forma alternativa, se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*. Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas de células de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Se somete a ensayo el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. En algunos modos de realización, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, polipéptido A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión, que, a continuación, se transfieren en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen polipéptido inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plüthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otro modo de realización, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante reorganización de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)) o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos distintos de inmunoglobulina se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación a antígeno que tenga especificidad

por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo es IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG.

Fragmentos de anticuerpo

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos inalterados (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 se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En algunos modos de realización, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

Variantes y modificaciones de los polipéptidos

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de las proteínas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la proteína. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de una proteína introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de la proteína. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas.

Polipéptidos variantes

"Variante de polipéptido" significa un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia natural de longitud completa del polipéptido, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Dichas variantes de polipéptido incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o delecionan uno o más residuos de aminoácido en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa, al menos aproximadamente cualquiera de un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto a una secuencia de polipéptido de secuencia natural de longitud completa, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Opcionalmente, los polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución de aminoácidos conservadora en comparación con la secuencia de polipéptido natural, de forma alternativa, no más de aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con la secuencia de polipéptido natural.

El polipéptido variante se puede trancar en el extremo N o en el extremo C, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con un polipéptido natural de longitud completa. Determinados polipéptidos variantes pueden carecer de residuos de aminoácido que no sean esenciales para una actividad biológica deseada. Estos polipéptidos variantes con truncamientos, delecciones e inserciones se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los polipéptidos variantes deseados se pueden sintetizar químicamente. Otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ácido nucleico se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los polipéptidos variantes comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido nativo divulgado en el presente documento.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo), tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Se pueden encontrar directrices para determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o delecionar sin afectar negativamente a la actividad deseada comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas de polipéptido conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de homología alta.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para que afecten a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan, a continuación, introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza una mutagénesis aleatoria o por barrido de Ala en el codón o región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la tabla 1, o como se describe además a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 1.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
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

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
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

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del polipéptido seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

De forma alternativa, los residuos naturales se pueden dividir en grupos en base a propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se puede(n) añadir (un) enlace(s) de cisteína al polipéptido para mejorar su estabilidad (en particular, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un ejemplo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del que se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hiperavariale (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas así se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban a continuación por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y la diana. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas detalladas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del polipéptido altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. El polipéptido puede comprender restos distintos de aminoácidos. Por ejemplo, se puede glucosilar el polipéptido. Dicha glucosilación se puede producir de forma natural durante la expresión del polipéptido en la célula huésped u organismo

huésped, o puede ser una modificación intencionada que surja de la intervención humana. Por alteración se entiende delecionar uno o más restos glucídicos encontrados en el polipéptido y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el polipéptido.

La glucosilación del polipéptido es típicamente unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida a O se refiere al acoplamiento de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al polipéptido se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unida a O).

Se puede conseguir la eliminación de los restos glucídicos presentes en el polipéptido química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de codones que codifican residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glucosilación. Se puede lograr la escisión enzimática de restos glucídicos en polipéptidos mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutamilo y asparaginilo con respecto a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos γ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Polipéptidos quiméricos

El polipéptido descrito en el presente documento se puede modificar de manera que forme moléculas quiméricas que comprendan el polipéptido fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido de marca que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítipo se dispone, en general, en el extremo amínico o carboxílico del polipéptido. La presencia de dichas formas con marca de epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo frente al polipéptido de marca. Además, la provisión de la marca de epítipo posibilita que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo antimarca u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la marca de epítipo.

Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por c-met y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, se pueden unir anticuerpos biespecíficos a dos epítopos diferentes de c-met. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para células que expresan c-met. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la genomanipulación de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas con Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocaténarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende

un sitio de unión a antígeno que se une a c-met, así como otro antígeno diferente, tal como EGFR (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

Son conocidos en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferente tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En un modo de realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferente comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano) (botones o protuberancias). Se crean "cavidades" (ojales) compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros. Los botones y ojales se describen además en el presente documento.

Botones en ojales

El uso de botones en ojales como procedimiento de producción de anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos de un brazo es bien conocido en la técnica. Véase la patente de EE. UU. n.º 5.731.168 concedida el 24 de marzo de 1998 cedida a Genentech, publicación PCT n.º WO2009089004 publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Amgen, y publicación de patente de EE. UU. n.º 20090182127 publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Novo Nordisk A/S. Véase también Marvin y Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658 y Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*, 26:1-9. Aquí se proporciona un breve análisis.

Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la interfase de un primer polipéptido y es, por lo tanto, posicionable en una cavidad compensatoria en la interfase adyacente (es decir, la interfase de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero y, de este modo, favorecer la formación de heteromultímeros sobre la formación de homomultímeros, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfase original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfase del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfase del primer polipéptido se reemplaza con el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "importado" que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente importado. El límite superior para el número de residuos originales que se

reemplazan es el número total de residuos en la interfase del primer polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos de aminoácido se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Propiedades de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de una letra	MASA ^a (daltons)	VOLUMEN ^b (angstrom ³)	Área de superficie accesible ^c (angstrom 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 de aminoácido menos el de agua. Valores de Handbook of Chemistry and Physics, 43.^a ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

^b Valores de A.A. Zamyatnin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:107-123, 1972.

^c Valores de C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1975. El área de superficie accesible se define en las figuras 6-20 de esta referencia.

Los residuos importados preferentes para la formación de una protuberancia son en general residuos de aminoácido naturales y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Los más preferentes son triptófano y tirosina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio CH3 para formar la protuberancia incluyen, sin limitación, la sustitución T366W.

Una "cavidad" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que se retrae de la interfase de un segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia correspondiente en la interfase adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfase original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfase del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfase del segundo polipéptido se reemplaza con el ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido "importado" que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente importado. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfase del segundo polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos de aminoácido se muestran en la tabla 2 anterior. Los residuos importados preferentes para la formación de una cavidad son normalmente residuos de aminoácido naturales y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). Los más preferentes son serina, alanina o treonina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio CH3 para generar la cavidad incluyen, sin limitación, las sustituciones T366S, L368A y Y407A.

Un residuo de aminoácido "original" es uno que se reemplaza por un residuo "importado" que puede tener un volumen de cadena lateral más pequeño o más grande que el residuo original. El residuo de aminoácido importado puede ser un residuo de aminoácido natural o no natural, pero preferentemente es el primero. Los residuos de aminoácido "naturales" son los residuos codificados por el código genético y enumerados en la tabla 2 anterior. Por residuo de aminoácido "no natural" se quiere decir un residuo que no se codifica por el código genético, pero que puede unir de forma covalente residuo(s) de aminoácido adyacente(s) en la cadena polipeptídica. Ejemplos de residuos de aminoácido no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácido tales como los descritos en Ellman *et al.*, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991), por ejemplo. Para generar dichos residuos de aminoácido no naturales, se pueden usar los procedimientos de Noren *et al.* *Science* 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, *supra*. En resumen, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de transcripción y traducción *in vitro* del ARN. El procedimiento de la presente invención implica reemplazar al menos un residuo de aminoácido original, pero se puede reemplazar más de un residuo original. Normalmente, no más de los residuos totales en la interfase del primer o segundo polipéptido comprenderán residuos de aminoácido originales que se reemplazan. Típicamente, los residuos originales para reemplazo están "enterrados". Por "enterrado" se quiere decir que el residuo es esencialmente inaccesible para el disolvente. En general, el residuo importado no es cisteína para evitar la posible oxidación o emparejamiento incorrecto de enlaces disulfuro.

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad, lo que quiere decir que la localización espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfase de un primer polipéptido y segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia se puede localizar en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y segundo polipéptidos en la interfase. Puesto que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp típicamente no se extienden perpendicularmente desde el eje de la interfase y tienen conformaciones preferentes, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en modelar el par protuberancia/cavidad en base a una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica.

Por "ácido nucleico original o molde" se quiere decir el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que se puede "alterar" (es decir, genomanipular o mutar) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que se ha sometido a alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se quiere decir que el ácido nucleico original se muta insertando, delecionando o reemplazando al menos un codón que codifica un residuo de aminoácido de interés. Normalmente, un codón que codifica un residuo original se reemplaza por un codón que codifica un residuo importado. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera se han revisado en Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, RU. (1991), e incluyen mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis en casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo. Al mutar un ácido nucleico original/molde, se altera por tanto de forma correspondiente un polipéptido original/molde codificado por el ácido nucleico original/molde.

La protuberancia o cavidad se puede "introducir" en la interfase de un primer o segundo polipéptido por medios sintéticos, por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, las técnicas para introducir residuos de aminoácido no naturales previamente descritos, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. En consecuencia, la protuberancia o cavidad que se "introduce" es "no natural", lo que quiere decir que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado).

En general, el residuo de aminoácido importado para formar la protuberancia tiene un número relativamente pequeño de "rotámeros" (por ejemplo, aproximadamente 3-6). Un "rotámero" es una conformación energéticamente favorable de una cadena lateral de aminoácido. El número de rotámeros de los diversos residuos de aminoácido se revisa en Ponders y Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987).

En un aspecto, un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de Fc se encuentran/interaccionan en una interfase. En algunos modos de realización en los que los primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfase, la interfase del segundo polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia (también denominada "botón") que se puede posicionar en una cavidad (también denominada "ojo") en la interfase del primer polipéptido de Fc (secuencia). En un modo de realización, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un modo de realización, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un modo de realización, la interfase del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del primer polipéptido de Fc, en la que la cavidad o protuberancia, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente. En algunos modos de realización en los que los primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfase, la interfase del primer polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido de Fc (secuencia).

En un modo de realización, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un modo de realización, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un modo de realización, la interfase del primer polipéptido de Fc comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia o cavidad, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente.

En un modo de realización, la protuberancia y cavidad comprenden cada una un residuo de aminoácido natural. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un residuo original de la interfase de un polipéptido molde/original con un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más grande que el residuo original. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza con un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más grande que el original. En un modo de realización, el residuo original es treonina. En un modo de realización, el residuo original es T366. En un modo de realización, el residuo de importación es arginina (R). En un modo de realización, el residuo de importación es fenilalanina (F). En un modo de realización, el residuo de importación es tirosina (Y). En un modo de realización, el residuo de importación es triptófano (W). En un modo de realización, el residuo de importación es R, F, Y o W. En un modo de realización, se genera una protuberancia reemplazando dos o más residuos en un polipéptido molde/original. En un modo de realización, el polipéptido Fc que comprende una protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al.* (pp. 688-696 en *Sequences of proteins of immunological interest*, 5.^a ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).

En algunos modos de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad se genera reemplazando un residuo original en la interfase de un polipéptido molde/original con un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo original. Por ejemplo, el polipéptido de Fc que comprende la cavidad se puede generar mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza con un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más pequeño que el original. En un modo de realización, el residuo original es treonina. En un modo de realización, el residuo original es leucina. En un modo de realización, el residuo original es tirosina. En un modo de realización, el residuo de importación no es cisteína (C). En un modo de realización, el residuo de importación es alanina (A). En un modo de realización, el residuo de importación es serina (S). En un modo de realización, el residuo de importación es treonina (T). En un modo de realización, el residuo de importación es valina (V). Se puede generar una cavidad reemplazando uno o más residuos originales de un polipéptido molde/original. Por ejemplo, en un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos modos de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina, y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan con residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos modos de realización, un aminoácido original que se reemplaza es T366, L368 y/o Y407. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 con serina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de leucina en la posición 368 con alanina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de tirosina en la posición 407 con valina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más reemplazos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En algunos modos de realización de estos fragmentos de anticuerpo, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*.

En un aspecto, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "botones" y "ojales" como se describe en el documento WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de ojal puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc, y una mutación de botón puede ser T366W.

V. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Para la producción recombinante de un polipéptido heterólogo (por ejemplo, un anticuerpo) usando DsbA y DsbC, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) se aísla y secuencía

fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se va a usar. En general, las células huésped preferentes son de cualquier origen procariótico. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal.

A. Generación de anticuerpos usando células huésped procariotas:

i. Construcción de vectores

Se pueden obtener secuencias de polinucleótidos que codifican componentes polipeptídicos del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. De forma alternativa, se pueden sintetizar polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Se pueden usar muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, la inserción de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan los vectores plasmídicos que contienen las secuencias del replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. El vector porta de manera ordinaria un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que pueden proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y proporciona, por tanto, medios fáciles para identificar las células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para que contengan, promotores que se pueden usar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.648.237.

Además, se pueden usar vectores de fagos que contienen secuencias del replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago tal como GEM™-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' a un cistrón que modula su expresión. Típicamente, los promotores procariotas se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles incrementados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. El promotor seleccionado se puede enlazar de forma funcional a ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN fuente por medio de digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Se puede usar tanto la secuencia del promotor natural como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos modos de realización se utilizan promotores heterólogos, ya que, en general, permiten una mayor transcripción y rendimientos más altos del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor de *tac* o el de *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un trabajador experto las ligue de forma funcional a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.*, (1980) *Cell* 20: 269), usando conectores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

La región de iniciación de la traducción (TIR) es un determinante principal del nivel de traducción global de una proteína. La TIR incluye el polinucleótido que codifica la secuencia señal, y se extiende desde inmediatamente la

dirección 5' de la secuencia Shine-Delgarno hasta aproximadamente veinte nucleótidos en dirección 3' del codón de iniciación. En general, el vector comprenderá una TIR, las TIR y las TIR variantes son conocidas en la técnica y los procedimientos para generar TIR son conocidas en la técnica. Se pueden crear una serie de variantes de secuencia de ácido nucleico con una gama de fuerzas traduccionales, proporcionando de este modo un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor para la segregación óptima de muchos polipéptidos diferentes. El uso de un gen indicador fusionado a estas variantes, tales como PhoA, proporciona un procedimiento para cuantificar las fuerzas traduccionales relativas de regiones de iniciación de la traducción diferentes. Las TIR variantes o mutantes se pueden proporcionar en el fondo de un vector plasmídico, proporcionando de este modo un conjunto de plásmidos en los que se puede insertar un gen de interés y medir su expresión, para establecer un intervalo óptimo de fuerzas traduccionales para la máxima expresión del polipéptido maduro. Las TIR variantes se describen en el documento USP 8.241.901.

En un aspecto de la invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de segregación que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de la presente invención debe ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal naturales con respecto a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de los polipéptidos señal de la presente invención. Adicionalmente, el vector puede comprender una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en los líderes de enterotoxina termoestable II (STII) o Lpp, penicilinas, fosfatasa alcalina, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP.

En un aspecto, uno o más polinucleótidos (por ejemplo, vectores de expresión) codifican conjuntamente un anticuerpo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera del anticuerpo y un polinucleótido separado codifica la cadena pesada del anticuerpo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo. En algunos modos de realización, uno o más polinucleótidos (por ejemplo, vectores de expresión) codifican conjuntamente un anticuerpo de un brazo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica (a) la cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y (b) el polipéptido de Fc. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y un polinucleótido separado codifica el polipéptido de Fc. En un modo de realización, polinucleótidos separados codifican el componente de cadena ligera del anticuerpo de un brazo, el componente de cadena pesada del anticuerpo de un brazo y el polipéptido de Fc, respectivamente. La producción de un anticuerpo de un brazo se describe, por ejemplo, en el documento WO2005063816.

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especie *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En un modo de realización, se usan células gramnegativas. En un modo de realización, se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp 1190-1219; n.º de depósito en ATCC 27325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ*hufA* (Δ*tonA*) *ptr3* *lacIq* *lacL8* Δ*ompTΔ* (nmpc-fepE) *degP41* *kanR* (patente de EE. UU. N.º 5.639.635) y las cepas 63C1 y 64B4. En algún modo de realización, la cepa de *E. coli* es un derivado de W3110 llamado 62A7 (Δ*hufA* (Δ*tonA*) *ptr3*, *lacIq*, *lacL8*, *ompTΔ* (nmpc-fepE) Δ*degP* *ilvG* reparada). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden usar adecuadamente las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como huéspedes cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula huésped debe segregar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de forma deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos en cultivos bacterianos, se pueden modificar las células bacterianas. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje apropiado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpo segregados, la célula huésped bacteriana puede comprender vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) para cotransformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas.

ii. Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o

amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación quiere decir introducir ADN en el huésped procariota de modo que el ADN sea replicable, como elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica usada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los complementos de nutrientes necesarios. En algunos modos de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

También se puede incluir cualquier complemento necesario, además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, en concentraciones apropiadas, introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotritol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferente varía desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente desde aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 y más preferentemente aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de *phoA* para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147) o medios descritos en el documento WO2002/061090. Se puede usar una variedad de otros inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como es conocido en la técnica.

En un modo de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se segregan en y recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, en general mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se rompen las células, se pueden eliminar los restos celulares o células enteras por centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. De forma alternativa, se pueden transportar proteínas en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden eliminar del cultivo y filtrar y concentrar el sobrenadante del cultivo para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar e identificar además usando procedimientos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de inmunoelectrotransferencia.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en grandes cantidades mediante un procedimiento de fermentación. Diversos procedimientos de fermentación discontinua a gran escala están disponibles para la producción de polipéptidos recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores con agitador para distribuir oxígeno y nutrientes, en especial glucosa (la fuente de carbono/energía preferente). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y que puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un procedimiento de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia típicamente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, etapa en la que las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como es conocido en la técnica y se describe anteriormente. Las células se pueden cultivar durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje apropiado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpo segregados, se pueden usar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas

chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) para cotransformar las células procarióticas huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun, (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.*, (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210. En algunos modos de realización, se expresan DsbA y C en la célula huésped bacteriana.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (en especial las que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar determinadas cepas huésped carentes de enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, se pueden modificar cepas de células huésped para efectuar (una) mutación/mutaciones genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Están disponibles algunas cepas carentes de proteasa de *E. coli* y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.*, (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En un modo de realización, se usan cepas de *E. coli* carentes de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

iii. Purificación de anticuerpos

Se pueden emplear procedimientos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al.*, (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de evitar la adherencia inespecífica de impurezas.

Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se describe anteriormente se aplica en la fase sólida con proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lava para eliminar las impurezas no unidas específicamente a la fase sólida. Por último, se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida mediante elución.

En algunos modos de realización de la invención, se analizan fracciones derivadas de una o más de las etapas de purificación para la eliminación de DsbA y/o DsbC. En algunos modos de realización, la eliminación de DsbA y/o DsbC se determina por inmunoensayo; por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en el presente documento.

La invención también proporciona inmunoconjugados (denominados de manera intercambiable "conjugados anticuerpo-fármaco" o "CAF") que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento conjugado a, por ejemplo, un agente citotóxico, tal como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

VI. Composiciones de DsbA y DsbC

En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones que comprenden DsbA ultrapura y/o la divulgación proporciona composiciones que comprenden DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, la composición comprende DsbA en la que la DsbA es mayor que aproximadamente cualquiera de un 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, o 99,5 % de DsbA monomérica. En algunos modos de realización, una composición que comprende un 95 % de DsbA monomérica es una composición en la que menos de un 5 % del material en la preparación son otras sustancias que estaban presentes en las células o lisados celulares (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) presentes durante la producción de la DsbA. En algunos modos de realización, el porcentaje de polipéptido de DsbA monomérica se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, SEC-HPLC). En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de bajo peso molecular (por ejemplo, especies con un peso molecular menor que la DsbA monomérica medido por SEC o SDS-PAGE). En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente un 2 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de alto

peso molecular (por ejemplo, especies con un peso molecular mayor que la DsbA monomérica medido por SEC o SDS-PAGE). En algunos modos de realización, la composición que comprende la DsbA ultrapura comprende menos de aproximadamente un 1 % de especies de alto peso molecular.

En algunos modos de realización de la invención, la composición que comprende DsbC en la que la DsbC es mayor que aproximadamente cualquiera de un 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, o 99,5 % de DsbC monomérica. En algunos modos de realización, una composición que comprende un 95 % de DsbC monomérica es una composición en la que menos de un 5 % del material en la preparación son otras sustancias que estaban presentes en las células o lisados celulares (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, presentes durante la producción de la DsbC. En algunos modos de realización, el porcentaje de polipéptido de DsbC monomérica se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, SEC-HPLC). En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de bajo peso molecular (por ejemplo, especies con un peso molecular menor que la DsbC monomérica medido por SEC o SDS-PAGE). En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente un 2 % de especies de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de especies de alto peso molecular (por ejemplo, especies con un peso molecular mayor que la DsbC monomérica medido por SEC o SDS-PAGE). En algunos modos de realización, la composición que comprende la DsbC ultrapura comprende menos de aproximadamente un 1 % de especies de alto peso molecular.

En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbA o DsbC altamente purificada se formula para su uso. En algunos modos de realización, la composición que comprende DsbA o DsbC ultrapura se formula para inmunizar animales para generar anticuerpos frente a DsbA o DsbC; por ejemplo, añadiendo adyuvantes para facilitar la generación de una respuesta inmunitaria. En otros modos de realización, la composición que comprende DsbA o DsbC ultrapura se formula para su uso en inmunoensayos; por ejemplo, como un control positivo o como una curva patrón.

VII. Generación de anticuerpos frente DsbA y DsbC

En determinados aspectos, la invención proporciona DsbA ultrapura y la divulgación proporciona DsbC ultrapura para usar como inmunógeno para generar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales y/o anticuerpos monoclonales) para su uso en inmunoensayos para analizar muestras de polipéptidos recombinantes para determinar la presencia de DsbA y/o DsbC. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar en inmunoensayos para detectar y/o cuantificar DsbA y/o DsbC en muestras de polipéptidos recombinantes donde el polipéptido recombinante se produjo en células bacterianas que sobreexpresan DsbA y/o DsbC. En algunos modos de realización, la invención proporciona anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbA ultrapura y/o anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbC ultrapura. En algunos aspectos, los anticuerpos policlonales se unen específicamente a diferentes epítomos de DsbA o DsbC y, por lo tanto, proporcionan utilidad para detectar fragmentos de DsbA o DsbC, variantes, proteínas plegadas incorrectamente, etc. Para minimizar la generación de anticuerpos de conejo contra las impurezas de proteínas de la célula huésped, lo que podría dar como resultado una sobrecuantificación del nivel de DsbA o DsbC en las muestras que se miden en el inmunoensayo, los animales (por ejemplo, conejos) se inmunizan con DsbA o DsbC ultrapura.

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a DsbA y la divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a DsbC. En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se obtienen preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con un polipéptido que sea inmunógeno en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster sulfosuccinimida de maleimidobenzol (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg del polipéptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del valor. En algunos modos de realización, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con un polipéptido diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden elaborar en cultivo celular recombinante como fusiones polipeptídicas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación, tal como el alumbre, para mejorar la respuesta inmunitaria.

En algunos modos de realización, el animal inmunizado con DsbA o DsbC es una cabra, un conejo, un ratón, una cobaya, un hámster, una rata, un burro o un pollo.

En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA o DsbC son anticuerpos monoclonales. Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que surjan durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales. Como se describe anteriormente, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU n.º 4.816.567).

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para purificar anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, que comprenden poner en contacto una composición que comprende anticuerpos anti-DsbA con material de cromatografía que comprende DsbA ultrapura unida a un material de soporte, lavar el material de cromatografía para eliminar compuestos no unidos y eluir los anticuerpos anti-DsbA. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura que está acoplada al material de soporte comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbA. En algunos modos de realización, menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % de los anticuerpos policlonales se unen específicamente compuestos distintos de DsbA.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para purificar anticuerpos que se unen específicamente a DsbC, que comprenden poner en contacto una composición que comprende anticuerpos anti-DsbC con material de cromatografía que comprende DsbC ultrapura unida a un material de soporte, lavar el material de cromatografía para eliminar compuestos no unidos y eluir los anticuerpos anti-DsbC. En algunos modos de realización, la DsbA ultrapura que está acoplada al material de soporte comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % de impurezas. En algunos modos de realización, la DsbC ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar anticuerpos policlonales que se unen específicamente a DsbC. En algunos modos de realización, menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % de los anticuerpos policlonales se unen específicamente compuestos distintos de DsbC.

En algunos modos de realización, los anticuerpos anti-DsbA y/o anti-DsbC se purifican poniendo en contacto los anticuerpos con DsbA o DsbC ultrapura inmovilizada en un material de cromatografía (por ejemplo, DsbA y/o DsbC ultrapuras inmovilizadas en vidrio de poro controlado con glicerilo activado). En algunos modos de realización, los anticuerpos se concentran, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio antes del contacto con la DsbA o DsbC inmovilizada. En algunos modos de realización, los anticuerpos se unen a DsbA o DsbC inmovilizada y a continuación los complejos de DsbA o DsbC inmovilizada-anticuerpo se lavan para eliminar las impurezas no unidas. En otros modos de realización, los anticuerpos se eluyen de la DsbA o DsbC inmovilizada eluyendo con un tampón a un pH diferente como el tampón de carga; por ejemplo, los anticuerpos se unen a la DsbA o DsbC inmovilizada a un pH neutro (por ejemplo, pH 7,2) y se eluyen a pH ácido (por ejemplo, pH 2,0). En algunos otros modos de realización, los anticuerpos anti-DsbA o anti-DsbC se someten a cromatografía adicional; por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, los anticuerpos anti-DsbA o anti-DsbC purificados (por ejemplo, anticuerpos policlonales) se someten a ensayo para determinar su unión a DsbA o DsbC ultrapura, respectivamente.

VIII. Inmunoensayos con anticuerpos frente a DsbA y DsbC

En algunos modos de realización, la invención proporciona un procedimiento para analizar una muestra de polipéptido recombinante para determinar la presencia y/o cantidad de DsbA, que comprende detectar DsbA en la muestra usando un inmunoensayo y comparar la cantidad de DsbA detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de impurezas. En algunos modos de realización, el patrón de referencia de DsbA ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura se unen a menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de compuestos distintos de DsbA. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura son anticuerpos policlonales. En otros modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura son anticuerpos monoclonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen

específicamente a DsbA ultrapura se usan como anticuerpos de captura en el inmunoensayo. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura se usan como anticuerpos de detección. En algunos modos de realización, los anticuerpos de detección se conjugan con un agente de detección (por ejemplo, una peroxidasa de rábano picante). En algunos modos de realización, la DsbA es una DsbA de *E. coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*). En algunos modos de realización, la célula huésped sobreexpresa DsbA (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresaba DsbA). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular o se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algún modo de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA ultrapura pueden detectar menos de aproximadamente 50 ng/ml, 25 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml y/o 1,5 ng/ml de DsbA en un inmunoensayo.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona un procedimiento para analizar una muestra de polipéptido recombinante para determinar la presencia y/o cantidad de DsbC, que comprende detectar DsbC en la muestra usando un inmunoensayo y comparar la cantidad de DsbC detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, la preparación comprende menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de impurezas. En algunos modos de realización, el patrón de referencia de DsbC ultrapura se prepara mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se unen a menos de aproximadamente cualquiera de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % de compuestos distintos de DsbC. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura son anticuerpos policlonales. En otros modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura son anticuerpos monoclonales. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se usan como anticuerpos de captura en el inmunoensayo. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura pueden detectar menos de aproximadamente 50 ng/ml, 35 ng/ml, 25 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,5 ng/ml y/o 1 ng/ml de DsbC en un inmunoensayo. En algunos modos de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a DsbC ultrapura se usan como anticuerpos de detección. En algunos modos de realización, los anticuerpos de detección se conjugan con un agente de detección (por ejemplo, una peroxidasa de rábano picante). En algunos modos de realización, la DsbC es una DsbC de *E. coli*. En algunos modos de realización, el polipéptido recombinante se prepara en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*). En algunos modos de realización, la célula huésped sobreexpresa DsbC (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* que sobreexpresaba DsbC). En algunos modos de realización, la muestra es lisado celular o se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante y en la que la preparación de polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algún modo de realización, la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos de inmunoensayo para la detección y cuantificación de DsbA y DsbC. Dichos procedimientos se pueden usar para la detección y cuantificación de DsbA y DsbC en preparaciones de polipéptido recombinante producidas en células huésped, por ejemplo, *E. coli*, donde DsbA y/o DsbC se sobreexpresan para facilitar el plegamiento y ensamblaje de polipéptidos. En algunos modos de realización, los procedimientos de inmunoensayo usan captura y detección de anticuerpos anti-DsbA o DsbC descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, los anticuerpos se usan en cualquier procedimiento de inmunoensayo conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo de tipo sándwich, ensayo mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ensayo electroquímico (ECL), inmunoensayo magnético. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de la preparación de polipéptido recombinante con un anticuerpo anti-DsbA o anti-DsbC como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-DsbA o anti-DsbC a DsbA o DsbC, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-DsbA o anti-DsbC y DsbA o DsbC, respectivamente.

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos anti-DsbA y/o anti-DsbC marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-DsbA o anti-DsbC de captura se inmoviliza en una fase sólida. En algunos modos de realización, la fase sólida usada para la inmovilización es cualquier soporte o vehículo inerte que es esencialmente insoluble en agua y útil en ensayos inmunométricos, incluyendo soportes en forma de, por ejemplo, superficies, partículas, matrices porosas, microesferas y similares. Ejemplos de soportes usados comúnmente incluyen pequeñas láminas, SEPHADEX®, geles, cloruro de polivinilo, microesferas de plástico y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados a partir de polietileno, polipropileno, poliestireno, y similares, incluyendo placas de microvaloración de 96 pocillos, así como materiales particulados tales como papel de filtro, agarosa, dextrano reticulado y otros polisacáridos. De forma alternativa, las matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en la patente de EE. UU. n.ºs 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean adecuadamente para la inmovilización de reactivos de captura. En algunos modos de realización, los reactivos de captura inmovilizados se recubren en una placa de microvaloración que se puede usar para analizar varias muestras a la vez. Las placas de microvaloración ejemplares incluyen, pero no se limitan a, MICROTTEST®, MAXISORB®, NUNC MAXISORB® e IMMULON®. La fase sólida se recubre con los reactivos de captura como se define anteriormente, que se pueden unir por una interacción no covalente o covalente o enlace físico, según se desee. Las técnicas de acoplamiento incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 4.376.110 y las referencias citadas en la misma. Si es covalente, la placa u otra fase sólida se incuba con un agente de reticulación conjuntamente con el reactivo de captura en condiciones bien conocidas en la técnica, tal como durante una hora a temperatura ambiente. En algunos modos de realización, las placas se apilan y recubren con mucha antelación del ensayo en sí, y a continuación el ensayo se lleva a cabo simultáneamente en varias muestras de forma manual, semiautomática o automática, tal como usando la robótica.

En algunos modos de realización, las placas recubiertas se tratan con un agente de bloqueo que se une de forma no específica y satura los sitios de unión para evitar la unión no deseada del ligando libre a los sitios en exceso en los pocillos de la placa. Los ejemplos de agentes de bloqueo apropiados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, gelatina, seroalbúmina bovina, albúmina de huevo, caseína y leche descremada. El tratamiento de bloqueo típicamente se lleva a cabo en condiciones de temperatura ambiente durante un período de tiempo, típicamente aproximadamente 1-4 horas.

En algunos modos de realización, después del recubrimiento y el bloqueo, la muestra que se va a analizar, diluida apropiadamente, se añade a la fase inmovilizada. Los tampones ejemplares que se pueden usar para la dilución para este propósito incluyen, pero no se limitan a, (a) solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene BSA al 0,5 %, detergente TWEEN 20® al 0,05 % (P20), antibiótico PROCLIN® 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, tensioactivo 3-((3-cholamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS) al 0,25 %, un 0,2 % de beta-gammaglobulina y NaCl 0,35 M; (b) PBS que contiene seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 %, P20 al 0,05 % y PROCLIN® 300 al 0,05 %, pH 7; (c) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN® 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, y NaCl 0,35 M, pH 6,35; (d) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN® 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, un 0,2 % de beta-gammaglobulina, y NaCl 0,35 M; y (e) PBS que contiene BSA al 0,5 %, P20 al 0,05 %, PROCLIN® 300 al 0,05 %, EDTA 5 mM, CHAPS al 0,25 % y NaCl 0,35 M.

Las condiciones para la incubación de la muestra y el reactivo de captura inmovilizado se seleccionan para maximizar la sensibilidad del ensayo y minimizar la disociación, y para asegurar que cualquier analito de interés presente en la muestra (como DsbA o DsbC) se una al reactivo de captura inmovilizado. Opcionalmente, la muestra se separa (por ejemplo, mediante lavado) de los reactivos de captura inmovilizados para eliminar el material no capturado. La solución usada para el lavado es en general un tampón (por ejemplo, "tampón de lavado"). También se puede añadir un agente de reticulación u otro agente adecuado en esta fase para permitir que el material de interés ahora unido (por ejemplo, DsbA o DsbC) se una covalentemente a los reactivos de captura si existe alguna preocupación por que el material capturado de interés se pueda disociar en cierta medida en las etapas posteriores.

Los reactivos de captura inmovilizados con cualquier material de interés unido presente se ponen en contacto con un anticuerpo anti-DsbA o anti-DsbC de detección. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección está biotinilado. En algunos modos de realización, el medio de detección para el marcador biotinilado es avidina o estreptavidina-HRP. En algunos modos de realización, la lectura de los medios de detección es fluorimétrica o colorimétrica.

El nivel de cualquier material libre de interés de la muestra (por ejemplo, DsbA o DsbC) que ahora está unido a los reactivos de captura se mide o cuantifica usando un medio de detección para el anticuerpo de detección. En algunos modos de realización, la medición o cuantificación comprende comparar la reacción que se produce como resultado de las etapas anteriores con una curva patrón para determinar el nivel de material de interés (por ejemplo, DsbA o DsbC) en comparación con una cantidad conocida.

El anticuerpo añadido a los reactivos de captura inmovilizados se marcará directamente o se detectará indirectamente mediante la adición, después de la retirada por lavado del exceso de primer anticuerpo, de un exceso molar de un segundo anticuerpo marcado dirigido contra IgG de la especie animal del primer anticuerpo. En el último caso, el ensayo indirecto, se añaden antisueros marcados contra el primer anticuerpo a la muestra para producir el anticuerpo marcado *in situ*.

El marcador usado para el primer o segundo anticuerpo es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión del material libre de interés (por ejemplo, DsbA o DsbC) al primer o segundo anticuerpos. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen los conocidos para su uso en inmunoensayos, tal como los enumerados anteriormente.

Están disponibles procedimientos convencionales para unir covalentemente estos marcadores a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, se pueden usar agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bisimidatos, benzidina bisdiazotizada y similares, para etiquetar los anticuerpos con los marcadores enzimáticos quimioluminiscentes y fluorescentes descritos anteriormente. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.940.475 (fluorimetría) y la patente de EE. UU. n.º 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature* 144:945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407-412 (1982). En algunos modos de realización, el marcador es biotina usando estreptavidina-HRP para medios de detección.

La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, al anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para un experto en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan *et al.* "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166.

Después de la adición del último anticuerpo marcado, la cantidad de anticuerpo unido se determina eliminando el exceso de anticuerpo marcado no unido mediante lavado y a continuación midiendo o cuantificando la cantidad del marcador acoplado usando un procedimiento de detección apropiado para el marcador, y correlacionando la cantidad medida con el cantidad del anticuerpo de interés en la muestra biológica. Por ejemplo, en el caso de las enzimas, la cantidad de color desarrollado y medido será una medición directa que permitirá la cuantificación de la cantidad del anticuerpo de interés presente. En un modo de realización, HRP es el marcador y el color se detecta usando el OPD de sustrato a una absorbancia de 490 nm.

En un ejemplo, después de lavar un segundo anticuerpo marcado con enzima dirigido contra el primer anticuerpo no marcado de la fase inmovilizada, se desarrolla el color o quimioluminiscencia y se mide incubando el reactivo de captura inmovilizado con un sustrato de la enzima. A continuación, la concentración del material de interés (por ejemplo, DsbA o DsbC) se calcula comparando con el color o la quimioluminiscencia generada por la serie estándar en paralelo.

En algunos modos de realización, la invención proporciona ensayos de calidad para composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido recombinante preparado en bacterias que comprenden DsbA y/o DsbC para facilitar el plegamiento y ensamblaje de proteínas. En algunos modos de realización, la célula bacteriana sobreexpresa DsbA y/o DsbC. En algunos modos de realización, la célula bacteriana es una célula de *E. coli*. En algunos modos de realización, la célula bacteriana es una célula de *E. coli* que sobreexpresaba DsbA y/o DsbC. En algunos modos de realización, el ensayo de calidad comprende someter una muestra de la composición que comprende el polipéptido recombinante a inmunoensayos para detectar DsbA o DsbC en el que la detección de DsbA o DsbC por encima de determinadas cantidades indica que la composición farmacéutica del polipéptido terapéutico no es adecuada para su administración a un animal. En algunos modos de realización, la muestra de la composición que comprende el polipéptido recombinante es un lisado celular. En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de la composición que comprende el polipéptido recombinante en la que el polipéptido recombinante se ha sometido a una o más etapas de purificación cromatográfica. En algunos modos de realización, la composición que comprende el polipéptido recombinante es el producto purificado final. En algunos modos de realización, una concentración de DsbA y/o DsbC de menos de aproximadamente cualquiera de 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0,9 ppm, 0,8 ppm, 0,7 ppm, 0,6 ppm, 0,5 ppm, 0,4 ppm, 0,3 ppm, 0,2 ppm o 0,1 ppm indica que la composición farmacéutica es adecuada para su administración a un animal.

IX. Artículos de fabricación y kits

Los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento y/o las formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento pueden estar contenidos en un artículo de fabricación. En algunos modos de realización, el artículo de fabricación comprende anticuerpos generados usando los polipéptidos de DsbA y/o DsbC ultrapuras descritos en el presente documento. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente que contiene el polipéptido, anticuerpo, formulación de polipéptido y/o la formulación de anticuerpo. Preferentemente, el artículo de fabricación comprende: (a) un recipiente que comprende una composición que comprende el polipéptido, anticuerpo, formulación de polipéptido y/o la formulación de anticuerpo descrita en el presente documento dentro del recipiente y (b) un prospecto con instrucciones para usar los polipéptidos y/o anticuerpos.

El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente retiene o contiene una formulación y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución

intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. En algunos modos de realización, el recipiente es una jeringa. En algunos modos de realización, la jeringa está además contenida dentro de un dispositivo de inyección. En algunos modos de realización, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

Se usa un "prospecto" para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre los usos del polipéptido, anticuerpo, formulación de polipéptidos y/o las formulaciones de anticuerpos.

En algunos modos de realización, la invención proporciona kits para la detección de DsbA en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, en el que el kit comprende anticuerpos anti-DsbA como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, la invención proporciona kits para la detección de DsbC en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, en el que el kit comprende anticuerpos anti-DsbC como se describe en el presente documento. Aún en otros modos de realización, la invención proporciona kits para la detección de DsbA y DsbC en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, en el que los kits comprenden anticuerpos anti-DsbA como se describe en el presente documento y anticuerpos anti-DsbC como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, la invención proporciona kits para la detección de DsbA en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, en el que la célula bacteriana (por ejemplo, una célula de *E. coli*) sobreexpresa DsbA y/o DsbC. En algunos modos de realización, los kits incluyen instrucciones de uso. En algunos modos de realización, los kits comprenden además DsbA y/o DsbC ultrapuras para su uso como un patrón de referencia en la generación de curvas patrón para cuantificar DsbA y/o DsbC en una muestra. En algunos modos de realización, los kits comprenden además DsbA y/o DsbC ultrapuras para su uso como controles positivos en un ensayo para detectar DsbA y/o DsbC en una muestra.

Todos los rasgos característicos divulgados en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada rasgo característico divulgado en esta memoria descriptiva se puede reemplazar por un rasgo característico alternativo que tenga el propósito igual, equivalente o similar. Por tanto, a menos que se establezca expresamente de otro modo, cada rasgo característico divulgado es solo un ejemplo de una serie genérica de rasgos característicos equivalentes o similares.

Se ilustran más detalles de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Los ejemplos a continuación pretenden ser puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no se debe considerar que limitan la invención de ningún modo. Se aportan los siguientes ejemplos y descripción detallada a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1. El ensayo para la proteína *E. coli* no mide adecuadamente DsbA o DsbC.

La disulfuro oxidoreductasa (DsbA) es un oxidante fuerte que puede oxidar las cisteínas en una proteína mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro para formar enlaces disulfuro. Es un catalizador principal de la formación de enlaces disulfuro en bacterias y promueve el plegamiento correcto de proteínas. De forma similar, la disulfuro oxidoreductasa (DsbC) es un enlace disulfuro isomerasa durante el plegamiento oxidativo de la proteína en el periplasma de la célula. DsbA y DsbC típicamente no se expresan a niveles altos en *E. coli*, pero se han usado *E. coli* que sobreexpresan DsbA y/o DsbC para mejorar el ensamblaje y plegado adecuados de proteínas eucarióticas heteromultiméricas, incluyendo anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos multispecíficos).

Para determinar si el ensayo para la proteína de *E. coli* (ECP) puede detectar y cuantificar adecuadamente la presencia de DsbA y/o DsbC, se añadieron muestras de DsbA o DsbC purificada al diluyente de ensayo (NaCl 0,15 M/NaPO₄ 0,1 M/0,1 % de gelatina de pescado/polisorbato 20 al 0,05 %/Proclin 300 al 0,05 %) a diferentes concentraciones y se sometieron a prueba en el ensayo de ECP (Zhu-Shimoni, J. *et al* , 2014, *Biotech and Bioeng.* 111: 2367-2379). Se usó seroalbúmina bovina como control negativo ya que un ensayo para la proteína de *E. coli* no debería detectar esta proteína de mamífero. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Detección mediante ensayo de ECP.

DsbA			DsbC		
Teórica (µg/ml)	Teórica (µg/ml)	Observada (µg/ml)	Teórica (µg/ml)	Observada (µg/ml)	% Recuperación
3530,0	3100,0	140,0	3100,0	140,0	4,5
1765,0	1550,0	109,1	1550,0	109,1	7,0

DsbA			DsbC		
Teórica (µg/ml)	Teórica (µg/ml)	Observada (µg/ml)	Teórica (µg/ml)	Observada (µg/ml)	% Recuperación
882,5	775,0	78,1	775,0	78,1	10,1
441,3	387,5	54,1	387,5	54,1	14,0
220,6	193,8	36,8	193,8	36,8	19,0
110,3	96,9	25,1	96,9	25,1	25,9
55,2	48,4	15,5	48,4	15,5	32,0
27,6	24,2	LTR	24,2	LTR	

Serolbúmina bovina		
Teórica (µg/ml)	Observada µg/ml	% Recuperación
2000,0	LTR	
1000,0	LTR	
500,0	LTR	
250,0	LTR	
125,0	LTR	
62,5	LTR	
31,3	LTR	
15,6	LTR	

LTR = menor que el intervalo

Los resultados muestran que el ensayo de ECP no detecta ni cuantifica adecuadamente DsbA ni DsbC. Además, los ensayos comerciales para detectar restos de *E. coli* (por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos de *E. coli*) como parte de los ensayos de liberación para proteínas terapéuticas preparadas en *E. coli* no identifican DsbA y/o DsbC porque estos ensayos se generan típicamente preparando anticuerpos policlonales frente a extractos celulares de *E. coli* donde la expresión de DsbA y/o DsbC es mínima. Como tal, existe la necesidad de preparar DsbA y/o DsbC ultrapuras para generar anticuerpos policlonales que sean altamente específicos para Dsb A y/o DsbC con una reactividad mínima a otras proteínas y/o ácido nucleico de *E. coli* que podrían interferir con ensayos de detección de DsbA y/o DsbC. Además, las preparaciones ultrapuras de DsbA y/o DsbC son útiles en la generación de patrones de DsbA y/o DsbC para la detección exacta de DsbA y/o DsbC en una preparación de polipéptidos terapéuticos y en la generación de controles positivos de DsbA y/o DsbC para asegurar la calidad del ensayo para la investigación y la producción comercial de polipéptidos.

Ejemplo 2. Purificación de DsbA ultrapura

Materiales y procedimientos

Etapas de extracción

Se expresó DsbA en *E. coli* (derivado W3110 llamado 62A7 Δ*h*uA (Δ*ton*A) *ptr*3, *lac*lq, *lac*L8, *ompT*Δ(*nmpc*-*fepE*) Δ*degP* *ilvG* reparado) (Joly, JC y Swartz JR 1994, *Biochem.* 33:4231-4236; Joly, JC y Swartz JR 1997, *Biochem.* 36:10067-10072; patente de EE. UU. N.º 5.789.199). Se suspendió la pasta de células (50 g de pasta de células/1 l) en MOPS 10 mM pH 7,1 y se mezcló hasta que la suspensión es homogénea. Se realizó lisis celular usando un microfluidificador 110F a 7000 psi. Se acondicionó el homogeneizado a PEI al 0,1 % (usando una solución madre de PEI al 10 %) y se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente (~21 °C). Se centrifugó la suspensión a 8500 rpm durante 30 min. Se recogió el concentrado y se filtró a través de un filtro Durapore de 0,22 µm.

Procedimientos de purificación

Todas las etapas de la cromatografía en columna se realizaron en AKTA Explorers de GE. La DsbA se extrajo de pasta de células de *E. coli* usando homogeneización y centrifugación. Se purificó el concentrado mediante cromatografía de intercambio aniónico en modo de unión y elución usando una columna Q Sepharose® FF (QSFF). A continuación, se purificó la agrupación de QSFF mediante cromatografía de intercambio catiónico en modo de unión y elución usando una columna Poros 50 HS. Las condiciones detalladas de desarrollo se describen en las tablas 4 y 5.

Etapas con Q-Sepharose®

Modo: unión y elución; Resina: Q-Sepharose® FF (GE); Altura de la columna: 20-30 cm; Caudal: 150 cm/h; Densidad de carga: ≤6 mg/ml).

Tabla 4: Procedimiento con QSFF

Etapa	Tampón	Volumen de columna
Preequil	Tris 25 mM, NaCl 1 M, pH 9,2, 86 mS/cm	4
Equilibrado	Tris 25 mM, pH 9,1, 0,3 mS/cm	4
Carga	Diluir con agua el concentrado (1:1), a continuación ajustar el pH a 9,0 con Tris Base 1,5 M pH 9,0, conductividad ~1,0 mS/cm	≤ 6 mg/ml
Lavado	Tampón de equilibrado	6
Elución	Tampón B: Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 9,2, 26 mS/cm 1.) B al 15 % para 4 VC 2.) B al 20 % para 4 VC 3.) B al 25 % para el resto de la fase de elución Pico de la fracción recogida (1 VC)	20
	La agrupación de QSFF se ajustó a pH 5,0 con ácido acético 2,0 M	
Lavado alto en sal	Tris 25 mM, NaCl 1 M, pH 9,2, 86 mS/cm	5
Desinfección	NaOH 0,5 N	≥ 30 minutos
Conservación	NaOH 0,1 N	3

- 5 Agrupamiento: Las agrupaciones se sometieron a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se agruparon en base a las fracciones que contenían la mayor cantidad de DsbA (datos no mostrados).

Poros 50 HS

- 10 Modo: unión y elución; Resina: Poros 50 HS (Applied Biosystems); Altura de la columna: 20-30 cm; Caudal: 150 cm/h; Densidad de carga: ≤6 mg/ml).

Tabla 5: Procedimiento con Poros 50HS

Etapa	Tampón	Volumen de columna
Equilibrado	MES 2,5 mM, pH 5,5, 0,4 mS	4
Carga	Agrupación de Q a pH ajustado a 5,0 con ácido acético 2 M, y a continuación diluido con agua (1:2) pH 5,0, 0,4 mS/cm	Según sea necesario
Lavado 1	Tampón de equilibrado	5
Elución	Tampón B: MES 12,5 mM, NaCl 250 mM pH 5,5, 25 mS/cm Gradiente B al 0 a 60 % en 15 VC Pico de la fracción recogida (1 VC)	15
Sal alta	MES 12,5 mM, NaCl 1 M, pH 5,5, 87 mS/cm	5
Desinfección	NaOH 0,5 N	≥ 30 minutos
Conservación	NaOH 0,1 N	3

- 15 Agrupamiento: Se analizaron n las fracciones y se agrupan en base a la pureza mediante gel SDS-PAGE y SEC (figs. 3 y 4).

Concentración de la agrupación de Poros 50 HS

- 20 La agrupación se concentró a ~3,0 mg/ml usando membranas Centricon (Millipore) de 10 kD que se centrifugaron durante ~30 min a 3000 rpm.

Procedimientos analíticos

- 25 *Determinación del valor*

Se cuantificó el valor del concentrado de DsbA con un ensayo de HPLC (Agilent 1100) usando una columna de SEC Superdex 200 10/300 de GE Healthcare (n.º ID 0619081). Se ejecutó la columna a 0,5 ml/min a temperatura ambiente.

Se equilibró la columna a 0,5 ml/min durante 60 minutos con fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH $6,2 \pm 0,1$. Se controló la absorbancia a 280 nm y se cuantificó el área del pico de elución. Se midió la absorbancia a 280 nm menos la absorbancia de fondo a 320 nm usando un coeficiente de extinción de $1,15 \text{ (mg/ml)} \cdot 1^{\circ} \text{ cm}^{-1}$.

5 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se determinaron la heterogeneidad de DsbA, el porcentaje de alto peso molecular, el monómero y los fragmentos usando una columna de SEC Superdex 200 10/300 de GE Healthcare (n.º ID 0619081). Se ejecutó la columna a temperatura ambiente en una HPLC (Agilent 1100) a 0,5 ml/min durante 60 minutos en fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH $6,2 \pm 0,1$. El volumen de inyección objetivo fue de 50 µg y se controló la absorbancia a 280 nm. Se calcularon las áreas de los picos usando el programa informático Chemstation de Agilent.

SDS-PAGE

15 Se realizó SDS-PAGE con geles prefabricados de Bis-Tris al 4-12 % (n.º de cat. De Invitrogen NP0322). Se tiñeron Los geles usando el procedimiento de tinción con plata Heukeshoven.

Inmunoelectrotransferencia

20 Se generó proteína de DsbA purificada. Se inmunizaron conejos y se agruparon las muestras de sangre extraídas finales y se purificaron por afinidad como se describe a continuación.

Para los análisis de inmunoelectrotransferencia, se transfirieron las proteínas de geles SDS a membranas de nitrocelulosa con un sistema de transferencia semiseco (n.º de cat. De iBlot Invitrogen SD1000). Se bloqueó la nitrocelulosa usando una solución 1X NET (A3017), gelatina al 0,5 % (n.º de catálogo de Bio-Rad 170-6539) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se diluyó un anticuerpo anti-DsbA principal 1:700K en 50 ml de 1× NET y se añadió a la nitrocelulosa bloqueada y se sondó durante la noche. Se produjo anticuerpo anti-DsbA inmunizando conejos con DsbA purificada. Se agruparon los antisueros de conejo, se purificaron por afinidad y se conservaron en PBS, pH 7,5, que contenía ácido de sodio al 0,1 %]. Se diluyó un anticuerpo secundario anti-HRP de conejo (n.º de cat. De GE Healthcare NA934V) 1:100K y se añadió a nitrocelulosa lavada durante dos horas.

Resultados

35 La DsbA se pudo unir a la columna usando tampones de pH 9.0 y carga. La fase de elución QSFF tuvo tres picos de elución distintos. Se analizaron fracciones de agrupación de QSFF seleccionadas a través del pico de elución usando una columna de SEC Superdex 200 10/300 GL (figura 1). Las impurezas de PMB se eluyen en el primer pico (fracción 3). El segundo pico se compone predominantemente de especies de PMA (fracción 7), y el tercer pico contenía la proteína DsbA diana (fracciones 10 y 11). El hombro con elución de la cola contenía especies de PMB adicionales y pequeñas cantidades de DsbA (fracción 15). Las fracciones que contenían la proteína DsbA se agruparon en base a los datos de cromatografía de exclusión por tamaño. La etapa de QSFF proporcionó una reducción parcial de especies de PMA y PMB; sin embargo, se implementó una etapa adicional de purificación en dirección 3' para mejorar adicionalmente la pureza de la DsbA.

45 Se implementó la resina Poros 50 HS para purificar la agrupación de QSFF. El análisis por SDS-PAGE de la agrupación de POROS 50 HS (fracciones 4 y 5) mostró que el pico principal contiene la proteína DsbA (fig. 2, carriles 6 y 7). La única banda que representa la proteína DsbA purificada tiene un peso molecular consecuente con una agrupación previamente purificada de DsbA (carril 2). Las especies de PMA y PMB se eluyeron más tarde en el gradiente y el lavado con alto contenido de sal (carriles 9 y 10). Los datos de la SEC de una serie representativa de Poros 50 HS se muestran en la figura 3. Las fracciones agrupadas de Poros 50HS (fracciones 4 y 5) mostraron que 50 PMA y PMB se eliminaron de la carga y las fracciones consistieron principalmente en proteína DsbA. No se observaron problemas de agregación con el material de DsbA purificada.

El procedimiento de cromatografía dio como resultado una DsbA ultrapura. La DsbA fue > 98 % como se muestra en la figura 4- un 98,2 % de pico principal según lo analizado por SEC con un 0,0 % de especies de PMA y un 1,8 % de especies de PMB y un 99,2 % del pico principal según lo analizado por SEC con un 0,0 % de especies de PMA y un 0,8 % de PMB. Se cuantificaron las impurezas por SEC como se muestra con la carga de Poros (agrupación Q) en la figura 3.

Ejemplo 3. Purificación de DsbC ultrapura

60 Se purificó previamente DsbC usando un procedimiento de cromatografía de dos etapas (tabla 6; procedimiento A). La proteína era necesaria para generar un patrón de referencia para el desarrollo de ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) y como inmunógeno para generar anticuerpos contra DsbC (en conejos) para su uso como sondas moleculares.

La masa de DsbC purificada del procedimiento de dos etapas se analizó mediante inmunoelectrotransferencia contra

un anti-DsbC de conejo disponible comercialmente. El análisis por SDS-PAGE reveló que la DsbC contenía varias proteínas relacionadas con la célula huésped de peso molecular más alto (PMA) (figura 5). Debido a estas impurezas, se generó nuevo material de DsbC para proporcionar un mayor nivel de pureza de DsbC, para minimizar la generación de anticuerpos de conejo contra impurezas de proteínas de la célula huésped, lo que podría dar como resultado una sobrecuantificación del nivel de DsbC en las muestras que se están midiendo en el ELISA.

Para conseguir este nivel deseado de pureza, se evaluaron varias etapas cromatográficas diferentes (así como su posición relativa en el procedimiento de purificación). Se evaluaron diferentes procedimientos para el rendimiento relativo para generar material adecuado para su uso como referencia y como inmunógeno (tabla 6).

Tabla 6. Procedimiento de purificación de DsbC

	Procedimiento A (original)	Procedimiento B	Procedimiento C	Procedimiento D	Procedimiento E (final)
Extracción	Resuspensión de la pasta de células				
	Lisis celular				
	Polímero catiónico/dilución				
	Centrifugación				
Cromatografía 1	Intercambio aniónico débil (AE): DEAE FF	AE débil	AE débil	AE débil	AE débil
Cromatografía 2	N/A	Intercambiador catiónico fuerte (CE): SPFF	CE fuerte	Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC): Fenilo FF (baja sust.)	Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC): Fenilo FF (baja sust.)
Cromatografía 3	N/A	N/A	Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC): Fenilo FF (baja sust.)	N/A	N/A
Cromatografía final/Intercambio de tampón	Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): Superdex 200	N/A	N/A	N/A	Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): Superdex 75

Extracción de células

Se suspendió pasta de células de *E. coli* (un derivado de W3110 llamado 62A7 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3, lacIq, lacL8, ompTA (nmpc-fepE) Δ degP ilvG reparado) (Joly, JC y Swartz JR 1994, *Biochem.* 33:4231-4236; Joly, JC y Swartz JR 1997, *Biochem.* 36:10067-10072; patente de EE. UU. N.º 5.789.199) (que contenía DsbC) en tampón de lisis (MOPS 10 mM, pH 7,0; 1 gramo de pasta de células por 10 ml de tampón de lisis). Se realizó la lisis celular (4 pases a 7-8 K psi) usando un Microfluidizer® (Microfluidics). Se le añadió polietilenimina (PEI; un floculante) al lisado a una concentración final de un 0,1 % (m/v) y a continuación se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la suspensión de PEI (10 K rpm, 45 min, 18 °C) y se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m antes de la cromatografía.

Purificación: Procedimiento A

Se cargó un total de 1,8 del concentrado clarificado (acondicionado con Tris base 1,5 M a pH 8,0) en una columna que contiene DEAE Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) en modo de unión y elución como se describe en la tabla 7. Al final de esta etapa, se recuperaron 694 mg de proteína que contenía DsbC.

Tabla 7. Procedimiento A Cromatografía de flujo rápido DEAE Sepharose®

Etapas	Tampón	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Preequil.	MOPS 250 mM, pH 7,1, acond. 6,2 mS/cm)	3	13,3
Equilibrado	A = MOPS 10 mM pH 7,1; acond. 0,3 mS/cm)	3	13,3
Carga	Concentrado clarificado (acondicionado a pH 8)	1,77 l	13,3
Lavado	Tampón de equil.	12	13,3

Etapas	Tampón	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Gradiente de elución (A)	MOPS 10 mM, pH 7,1, acond. 0,3 mS/cm)	B al 0-60 % para 15 VC	13,3
Gradiente de elución (B)	MOPS 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0; acond. 25 mS/cm)		13,3
Lavado alto en sal	MOPS 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,0; acond. ~86,7 mS/cm)	5	13,3
React/Conservación	NaOH 0,5 N/NaOH 0,1 N	5/5	13,3 (exposición de 30 min)

El perfil de elución para la columna DEAE Sepharose® se muestra en la figura 6. El análisis SDS-PAGE (figura 7) de los picos marcados como 1, 2 y 3 indica que las fracciones en el pico 1 contienen una banda prominente correspondiente a la masa molar prevista (~24 kDa) de DsbC. Se agruparon las fracciones del pico 1 y a continuación se analizaron por inmunoelectrotransferencia contra anti-DsbC de conejo. Los resultados de esta inmunoelectrotransferencia (figura 8A) confirmaron la presencia de DsbC. El análisis por SDS-PAGE revela una serie de bandas de peso molecular más alto y peso molecular más alto que no se iluminan en la inmunoelectrotransferencia, lo que indica que no están relacionadas con DsbC y que son impurezas relacionadas con la célula huésped (figura 8B). La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del procedimiento original (procedimiento A) podría eliminar algunas, pero no todas, de estas impurezas, ya que las proteínas que tienen masas molares cercanas a la de DsbC no estarían suficientemente separadas. Se evaluaron medios alternativos para la purificación en dirección 3' para ver qué procedimiento(s) y orden(órdenes) de etapas serían eficaces en la purificación de DsbC al nivel requerido de pureza para las indicaciones objetivo (descritas en la sección Antecedentes del reactivo).

Purificación: Procedimiento B

Se evaluaron los medios fuertes de cromatografía de intercambio catiónico, SP Sepharose Fast Flow®, (SP-FF; GE Healthcare), para la eliminación de las proteínas de la célula huésped de la agrupación de la cromatografía DEAE Sepharose® Fast Flow.

Se llevó a cabo el cribado de SP Sepharose® FF se llevó a cabo a valores de pH de 5,0, 5,5 y 6,0. La densidad de carga fue de 5 mg/ml. Los tampones fueron como sigue: A. Tampón de equilibrado/lavado: a pH 5 fue NaOAc 50 mM, 3,1 mS/cm; a pH 5,5 fue NaOAc 50 mM, 3,05 mS/cm; a pH 6 fue fosfato 20 mM, 3,18 mS/cm; B. Tampón de elución: a pH 5 fue NaCl 1 M en Equil A, 94 mS/cm; a pH 5,5 fue NaCl 1 M en Equil A, 92 mS/cm; a pH 6 fue NaCl 1 M en Equil A, 87 mS/cm. Se configuraron tres columnas de goteo, cada una con 1 ml de resina SPFF y se analizaron en los intervalos de pH apropiados. Se equilibraron las columnas (columnas PD10, Sephadex 25) con tampón de equilibrado para 10 VC. La carga era agrupación de DEAE que se había sometido a intercambio de tampón con el tampón de equilibrado de SP apropiado a pH 5, 5,5 y 6. Se lavaron las columnas con tampón de lavado para 7 VC. La elución fue con 5 VC cada una de B al 10 %, B al 20 %, B al 40 %, B al 60 %, B al 80 % y B al 100 %.

Las fracciones de columna para cada uno de los valores de pH analizados se evaluaron mediante SDS-PAGE. La mejor condición de unión se observó a pH 5,0. Los valores de pH crecientes dieron como resultado que de alguna a toda la agrupación de DEAE-FF sometida a intercambio de tampón fluyera a través de las columnas. Algunas, pero no todas, de las impurezas de la célula huésped se eliminaron a pH 5,0: se eliminó una única banda de peso molecular más bajo de ~20 kDa durante la carga de la columna.

Una concentración de NaCl creciente a 100 mM dio como resultado la elución incompleta de DsbC, pero eliminó varias bandas de P.M. más alto. Un incremento en NaCl a 200 mM eluyó la mayoría de las DsbC restantes, pero también eluyó varias otras impurezas de proteínas.

Los resultados iniciales en SP-FF justificaron una evaluación adicional a pH 5,0. Para evaluar el potencial de SP-FF para eliminar las impurezas de proteínas residuales de la célula huésped. Se llevó a cabo una purificación a pequeña escala usando los siguientes parámetros: Se cargó el concentrado clarificado en una columna que contenía SP Sepharose® Fast Flow en modo de unión y elución como se describe en la tabla 8. El análisis de las fracciones de columna SP-FF mostró la misma eliminación de la impureza de 20 kDa que se observó en la evaluación inicial, así como la eliminación de una banda a 37 kDa que eluyó antes en el gradiente (figura 9). Las fracciones de DsbC mostraron una pureza incrementada de esta etapa de cromatografía, pero todavía contenían impurezas residuales de P.M. más alto y cantidades menores de impurezas de P.M. más bajo (figura 9). El análisis de las fracciones SP-FF agrupadas por HPLC-SEC mostró un pico principal del 95,2 %, un 0,8 % de especies de PMA y un 0,4 % de especies de PMB. Como el gel SP-FF no eliminó las impurezas restantes a niveles suficientes, se evaluaron otros procedimientos de purificación.

Tabla 8. Cromatografía SP Sepharose Fast Flow

Etapa	Tampón	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Equilibrado	A = NaOAc 50 mM pH 5,0; acond. 3,5 mS/cm)	7	0,85
Carga	Agrupación de DEAE ajustada a pH 5.0 usando NaOAc, pH 5,0 (1:1), y a continuación diluida adicionalmente con agua purificada hasta que se acondicionó, alcanzó ~4 mS/cm.	todos	0,85
Lavado	Tampón de equilibrado	7	0,85
Gradiente de elución (A)	Tampón de equilibrado	B al 0-60 % para 20 VC	0,85
Gradiente de elución (B)	NaOAc 50 mM, NaCl 1 M, , pH 5,0; acond. 88 mS/cm Elución de gradiente: B al 0-60 % en 20 VC; fraccionado en gradiente de elución		0,85
Lavado alto en sal	NaOAc 50 mM, NaCl 1 M, , pH 5,0; acond. 88 mS/cm	5	0,85
React/Conservación	NaOH 0,5 N/NaOH 0,1 N	5/5	13,3 (exposición de 30 min)

Purificación: Procedimiento C

- 5 Se evaluó la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para la eliminación de las impurezas restantes en la agrupación SP-FF. En el desarrollo del procedimiento C, se evaluaron cinco medios de HIC potenciales (Hi propilo, fenil Sepharose® 6 Fast Flow (baja sustitución), fenil Sepharose® 6 Fast Flow (alta sustitución), butil Sepharose® 4 Fast Flow, y octil Sepharose® 4 Fast Flow) usando el mismo procedimiento de columna de 1,0 ml como se explica para la evaluación inicial de SP-FF (procedimiento B, anteriormente). Las condiciones cromatográficas se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Procedimiento C: DEAE-SPFF-HIC

Tamices de resina de HIC	Formato: Gravedad (procedimiento de goteo)		
	Densidad de carga: 3 mg/ml		
Resinas de HIC	1. Hi propilo		
	2. Fenil Sepharose 6 Fast Flow (baja sust.)		
	3. Fenil Sepharose 6 Fast Flow (alta sust.)		
	4. Butil Sepharose 4 Fast Flow		
	5. Octil Sepharose 4 Fast Flow		
Tampones	Equilibrio/lavado	Sulfato de amonio 0,6 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
	Elución	Sulfato de amonio 0,5 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
		Sulfato de amonio 0,4 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
		Sulfato de amonio 0,3 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
		Sulfato de amonio 0,2 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
		Sulfato de amonio 0,1 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7	
		Agua purificada (ap)	
Protocolo	Configuración de 5 columnas de goteo que contienen 0,5 ml de resina de HIC apropiada para someter a prueba		
	Equilibrado de columna	10 VC	

	Carga	Se diluyeron 7,5 mg de la agrupación de SPFF para contener una concentración final de sulfato de sodio 0,6 M, fosfato 50 mM, pH 7 Se usaron soluciones madre de sulfato de sodio 1,2 M y fosfato 1 M pH 7 para dilución pH final ajustado a 7, 68 mS/cm Se dividió la carga en 5. La densidad de carga para cada resina fue de 3 mg/ml.
	Lavado	7 CV (lavado 1 (4VC), lavado 2 (3VC))
	Elución (3 VC de cada)	Sulfato de amonio 0,5 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7
		Sulfato de amonio 0,4 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7
		Sulfato de amonio 0,3 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7
		Sulfato de amonio 0,2 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7
		Sulfato de amonio 0,1 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7
		Agua purificada (ap)
	Recoger la fracción y realizar SDS PAGE para evaluar la eliminación de impurezas	

El análisis de las fracciones de la columna por SDS-PAGE mostró que, para la mayoría de los medios de HIC evaluados, la mayoría de las impurezas de la célula huésped no se unieron a los geles y se eliminaron durante la carga y la etapa de lavado. Las impurezas adicionales mostraron diferencias en la unión a estos medios de HIC, pero se eliminaron con éxito usando un gradiente de sal decreciente (sulfato de sodio 0,5 M a sulfato de sodio 0,1 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0; (figura 10). Posteriormente se eluyó DsbC de cada uno de los medios de HIC con agua purificada (ap). Los resultados de SDS-PAGE muestran que la mayor cantidad de DsbC purificada se encuentra en la agrupación de fenil Sepharose® FF (baja sustitución) (figura 10).

Purificación: Procedimiento D

El orden de las tres etapas de cromatografía en el procedimiento C fue extremadamente eficaz para eliminar las impurezas residuales de la célula huésped presentes en la etapa inicial DEAE-FF para proporcionar DsbC muy pura. Se llevaron a cabo evaluaciones adicionales para ver si la etapa de HIC era lo suficientemente sólida como para eliminar las impurezas de la célula huésped de la agrupación de DEAE-FF, eliminando la etapa de SP-FF y racionalizando de manera eficaz el procedimiento de purificación para DsbC.

Para evaluar la etapa de HIC en la segunda posición, se acondicionó y procesó una parte alícuota de la agrupación de DEAE-FF usando las condiciones de HIC desarrolladas (tabla 6, procedimiento C). Un refinamiento adicional del procedimiento de HIC incluyó el reemplazo de las etapas de lavado intermedias con una etapa de lavado más prolongada con sulfato de sodio 0,1 M, fosfato de sodio 50 mM. El volumen de lavado adicional se implementó para eliminar las impurezas de la columna antes de eluir la DsbC con ap.

Para evaluar la etapa de HIC en la 3.^a posición, se realizó la misma estrategia experimental que se enumeró anteriormente, usando la agrupación de SP-FF fuerte en lugar de la agrupación de DEAE-FF. Estas reacciones se hicieron de la siguiente manera:

Esquema experimental: HIC en la posición 2- Agrupación de DEAE > HIC

HIC en la posición 3- Agrupación de DEAE>Agrupación de SPFF>HIC

Formato: gravedad (procedimiento de goteo)

Resina de HIC: Fenil Sepharose 6 Fast Flow (baja sust.)

Densidad de carga: 5 mg/ml

Tampones:

Equilibrado/lavado 1: Sulfato de amonio 0,6 M + fosfato de sodio 50 mM, pH 7

Lavado 2: sulfato de sodio 0,1 M + fosfato 50 mM, pH 7

Elución: ap = agua purificada

Se configuraron dos columnas de goteo, cada una con 1 ml de resina de HIC

Equilibrado (columna): 10 volúmenes de columna (VC)

Carga: HIC en la posición 2: tomó una agrupación de DEAE de 5 mg y la diluyó para contener una concentración final de sulfato de sodio 0,6 M/fosfato 50 mM, pH 7. pH final ajustado a 7; ~ 68 mS/cm.

HIC en la posición 3: tomó una agrupación de SPFF de 5 mg y la diluyó para contener una concentración final de sulfato de sodio 0,6 M/fosfato 50 mM, pH 7. pH final ajustado a 7; ~ 68 mS/cm.

Lavado 1: 5 VC

Lavado 2: 5 VC

Elución: 3 VC

3 VC extra

Regeneración básica: NaOH 0,1 N (2 VC)

Recoger fracciones y realizar SDS-PAGE para evaluar la eliminación de impurezas.

El procedimiento de dos etapas fue tan eficaz para eliminar las impurezas no deseadas de DsbC como lo fue el procedimiento de tres etapas (figura 11).

Purificación: Procedimiento E (procedimiento final)

La purificación de la agrupación de DEAE-FF se amplió usando fenil Sepharose® Fast Flow (baja sustitución). La tabla 10 enumera los parámetros de funcionamiento. Las fracciones de los picos principales fueron 7, 8, 9, 10 y 11 para la etapa de HIC.

La columna fue fenil Sepharose® (LS) en modo de unión y elución. La masa cargada en la columna fue de 536 mg.

Tabla 10. Cromatografía de fenil Sepharose Fast Flow (baja sust.)

Etapas	Tampón	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Equilibrado	Sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0	10	13,2
Carga	Se acondicionó carga de DEAE, se diluyó 1:1 con sulfato de sodio 1,2 M, 1:20 con fosfato de sodio 1 M y se ajustó a pH 7,0, ~68 mS/cm antes de cargar en la columna de HIC.	todos	13,2
Lavado 1	Sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0	7	13,2
Lavado 2	Sulfato de sodio 0,6 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0	7	13,2
Elución	Agua purificada, fraccionada cada 14 ml.	12	13,2

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones de columna mostró una muy buena eliminación de impurezas por la etapa de HIC. Se observaron dos bandas débiles (a 15 kDa y 50 kDa) en algunas de las fracciones individuales de HIC. Sin embargo, cuando se combinaron algunas o todas las fracciones principales, solo se observó una banda principal correspondiente a DsbC (figura 12). El análisis de las principales fracciones de DsbC (7-11) usando HPLC-SEC mostró una distribución de un 97,0 % de pico principal, un 1,0 % de P.M. bajo y un 2,0 % de P.M. alto. Tomar un corte más estrecho (fracciones 8-10) dio una distribución de un 98,2 % de pico principal, un 1,7 % de especies de P.M. bajo y un 0,1 % de P.M. más alto.

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), usando Superdex 75 (GE Healthcare), para eliminar cualquier especie residual de peso molecular alto y bajo y para formular DsbC. Se eligió Superdex 75 porque su intervalo de fraccionamiento (5 kDa a 70 kDa) se adapta mejor a una proteína más pequeña (~ 24 kDa) como DsbC. Los parámetros de funcionamiento para la columna de SEC se muestran en la tabla 11.

En preparación para la cromatografía de exclusión por tamaño, la agrupación de HIC (fracciones 7-11) se concentró a un volumen de ≤ 16 ml (≤ 5 % del CV de SEC) usando filtros centrífugos Amicon Ultra-3 (Millipore). Se centrifugaron en las unidades a 4000 rpm usando una centrífuga clínica (Eppendorf) durante intervalos de 20 min hasta que se alcanza el volumen objetivo.

Tabla 11. Cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 75

Etapa	Tampón	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Equilibrado	PBS, pH 7,0 ± 0,4	3	1
Carga	Agrupación de HIC concentrada	≤16 ml	1
		≤5 % de 1 VC	
Elución	PBS, pH 7,0 ± 0,4	1	1

Se cargó la agrupación de HIC concentrada en la columna de SEC, y la carga se persiguió con tampón de equilibrado. Se desarrolló la columna con tampón de equilibrado y se recogieron fracciones que representaban el 2 % del VC de SEC (6,4 ml). Se realizaron un total de dos series de exclusión por tamaño. Las fracciones principales (47-56) se analizaron por SDS-PAGE (figura 13) y mostraron 1 banda principal correspondiente a DsbC (~ 24 kDa). Las mismas fracciones también se sometieron a prueba en el ensayo por HPLC-SEC. El volumen final de DsbC formulado muestra un único pico altamente simétrico con una ligera cola en la parte posterior (figura 14). La etapa de SEC preparativa tuvo éxito en la eliminación adicional de impurezas y el intercambio de tampón de la masa de DsbC en el tampón de formulación final; el uso de HPLC-SEC mostró una distribución de un 99,85 % de pico principal, un 0,10 % de P.M. bajo y un 0,05 % de P.M. alto.

Estabilidad y análisis por congelación-descongelación

La estabilidad de la masa formulada se evaluó sometiéndola a tres ciclos de congelación-descongelación a una temperatura de ≤ -80 °C. El análisis de las muestras por congelación-descongelación se realizó usando SDS-PAGE y HPLC-SEC.

Se usó un total de 600 µl del volumen formulado para este estudio, dividido como cuatro partes alícuotas de 150 µl para cada punto de tiempo. Se colocó una alícuota en una sala fría (2-8 °C) (congelación-descongelación "0"). Las tres partes alícuotas restantes se colocaron en el congelador a ≤ -80 °C. Después de 4 horas, las muestras se descongelaron durante ~ 1 h a temperatura ambiente y se mezclaron suavemente. Una de las muestras se transfirió a la sala fría ("1" congelación-descongelación) y las muestras restantes se reemplazaron en el congelador a ≤ -80 °C. Este procedimiento se repitió, generando la muestra de "2" congelaciones-descongelaciones. La muestra restante ("3" congelaciones-descongelaciones) se conservó durante la noche en el congelador a ≤ -80 °C. La muestra de "3" congelaciones-descongelaciones se descongeló al día siguiente. Los resultados de SDS-PAGE ejecutada en condiciones reductoras y no reductoras muestran una banda correspondiente a DsbC (~24 kDa) en la masa purificada y en todas las muestras de congelación-descongelación (datos no mostrados). El ensayo por HPLC-SEC muestra que todas las muestras son comparables, con perfiles superpuestos con un 0,1 % de especies de PMA, un 99,9 % de pico principal y no se detectaron especies de PMB. La molécula conserva sus propiedades físicas y funcionales después de tres ciclos de congelación/descongelación.

SDS-PAGE y tinción SyproRuby

Para garantizar que no hubiera otras impurezas distintas de DsbC en la masa final formulada, se realizó SDS-PAGE y se tomó una imagen usando tinción SyproRuby (Bio-Rad; fig. 15).

Prueba funcional

La identidad de la molécula de DsbC se confirmó mediante un conjunto de ensayos de caracterización (análisis de secuencia N-terminal, huella peptídica (PMF), masa inalterada/reducida por CHIP TOF). Los ensayos confirmaron la identidad correcta de la molécula.

Se realizaron pruebas funcionales de las alícuotas de la masa de DsbC purificada y las muestras de congelación-descongelación generadas y se demostró la comparabilidad entre las cuatro muestras, lo que indica que la proteína era estable y funcional durante tres congelaciones-descongelaciones (datos no mostrados). La DsbC purificada se consideró aceptable para que las inmunizaciones de conejo generaran anticuerpos anti-DsbC y más tarde se usó como el ligando para la cromatografía de afinidad para purificar el anti-DsbC de los antisueros de conejo.

Ejemplo 4. Generación y purificación de anticuerpos anti-DsbA y anti-DsbC

Se generaron anticuerpos policlonales generados contra DsbA y DsbC ultrapuras para su uso en ensayos para medir la eliminación de DsbA y DsbC en la preparación de polipéptidos terapéuticos. El siguiente ejemplo describe los procedimientos de purificación usados para generar los anticuerpos policlonales frente a DsbA y DsbC. Estos reactivos críticos, junto con los inmunógenos de DsbA y DsbC, fueron necesarios para el desarrollo de los ELISA de DsbA y DsbC específicos.

Se inmunizaron tres conejos (por inmunógeno) con DsbA o DsbC. En el día 42, se extrajo sangre de conejos individuales y se usaron los antisueros de DsbA y DsbC para la purificación de anticuerpos anti-DsbA y anti-DsbC.

Procedimientos analíticos

5 Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para determinar la pureza relativa de los anticuerpos frente a DsbA y DsbC, así como para confirmar la masa molar de las proteínas. Se realizó electroforesis con y sin reducción de enlace disulfuro para evaluar la agregación covalente de los anticuerpos.

10 La SDS-PAGE se realizó usando geles Bio-Rad Criterion™ TGX 4-20 % (Tris-Glicina extendidas) Stain-Free™ y se tomó una imagen con un generador de imágenes Bio-Rad Criterion™ Stain Free™ (Laboratorios Bio-Rad).

15 Se usó cromatografía de líquidos de alto rendimiento por cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) para controlar la heterogeneidad de tamaño de los anticuerpos frente a DsbA y DsbC en condiciones naturales usando una columna TSK Gel 3000SWxl (Tosoh Bioscience) para separar especies de alto peso molecular (PMA), pico principal (monómero) y especies de bajo peso molecular (PMB).

Purificación de anticuerpos frente a DsbA y DsbC

20 La purificación de los anticuerpos frente a DsbA y DsbC se realizó en paralelo usando las mismas etapas de extracción y cromatografía. El procedimiento consiste en lo siguiente:

25 Precipitación de sal: Se realizó una etapa de fraccionamiento de sulfato de amonio (AS) al 60 % en los antisueros. Se disuelven los gránulos de sulfato de amonio al 60 % en un tampón de fosfato antes de la cromatografía de afinidad.

30 Cromatografía de afinidad inmovilizada (inmunógeno): la etapa de cromatografía de afinidad se diseñó para separar los anticuerpos diana de las impurezas restantes en el sedimento de sulfato de amonio al 60 %. Se usaron DsbA y DsbC purificadas (los mismos lotes de reactivos que se usaron para inmunizar a los conejos) como ligandos para construir soportes de afinidad separados. Cada soporte de afinidad se preparó mediante la inmovilización del inmunógeno específico a glicerilo-CPG activado (vidrio de poro controlado; Millipore) por medio química de aminación reductora. Este tipo de cromatografía de afinidad dio un alto grado de selectividad para los anticuerpos diana.

35 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): se usó SEC preparativa para separar las especies de peso molecular (P.M.) más alto y peso molecular (P.M.) más bajo de los anticuerpos diana y formularlas en un tampón de conservación adecuado. Posteriormente se determinó la funcionalidad de las agrupaciones de anticuerpos mediante sus respectivos ELISA para confirmar el rendimiento de los ensayos diana.

40 Las etapas cromatográficas realizadas y evaluadas para generar material adecuado para su uso en el desarrollo de los ELISA de DsbA y DsbC específicos.

Precipitación de antisueros y confirmación de anticuerpos diana

45 Se agruparon antisueros de conejo A, B, C (volumen = 72 ml (anti-DsbA), 76 ml (anti-DsbC). Se añadieron lentamente 52 ml de solución acondicionadora de sulfato de amonio (anteriormente) a la solución de anti-DsbA y se añadieron 55 ml a anti-DsbC con agitación suave durante toda la adición. Se centrifugaron Las soluciones a 13.000 rpm, a una temperatura de 18 °C durante 45 minutos. Se congelaron los gránulos de sulfato de amonio (que contienen anticuerpos frente a DsbA y DsbC) a ≤ -60 °C hasta que estuvieron listos para la cromatografía de afinidad.

50 El análisis por SDS-PAGE de las suspensiones de sulfato de amonio, los sobrenadantes y los gránulos confirma que los sobrenadantes se han agotado de los anticuerpos y los gránulos contienen todos los anticuerpos de conejo. Los anticuerpos anti-DsbA y anti-DsbC de conejo muestran masas molares de ~130 kDa. Tras la reducción, las bandas principales a ~130 kDa se redujeron a cadenas pesadas (~50 kDa) y cadenas ligeras (~25 kDa).

Cromatografía de afinidad

55 Los gránulos de sulfato de amonio al 60 % anti-DsbA y anti-DsbC se reconstituyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, antes de cargarlos en sus respectivas columnas de afinidad de DsbA-CPG o DsbC-CPG.

60 Las etapas de cromatografía de afinidad se realizaron como se describe en la tabla 12.

La resina era DsbA-CPG o DsbC-CPG. La cromatografía estaba en modo de unión y elución. La altura del lecho fue de 6,0 cm (DsbA-CPG) o 5,0 cm (DsbC-CPG). Los diámetros fueron 1,6 cm y los volúmenes fueron 12,0 o 10,0 ml.

Tabla 12. Condiciones de funcionamiento de la cromatografía de afinidad

Etapas	Descripción del tampón y pH	Volumen usado (VC)	Caudal (ml/min)
Equilibrado	PBS, acida de sodio al 0,02 %, pH 7,2	3	12,0
Carga	Extraído 60 % de sedimento AS (Nota 1)	60 ml por serie	1,2
Lavado	PBS, acida de sodio al 0,02 %, pH 7,2	3	1,2
Elución	PBS, acida de sodio al 0,02 %, pH 2,0 (Notas 2 y 3)	5	12,0
Preequilibrado	Tris 250 mM, acida de sodio al 0,02 %, pH 7,5	3	12,0

Los anticuerpos frente a DsbA y DsbC unidos de cada columna se eluyeron con 5 VC de tampón de elución, recogiendo los anticuerpos en un tampón Tris concentrado (para mantener un pH de 7,0 - 7,5, lo que minimizará la agregación de los anticuerpos debido al pH de elución muy bajo). Se recogió la agrupación de elución en un vaso de precipitados que contenía 17 ml de Tris 1,0 M, pH 7,5.

El análisis por SDS-PAGE de la agrupación de afinidad anti-DsbC mostró una banda prominente a ~130 kDa, correspondiente a los anticuerpos anti-DsbC de conejo diana y otras especies probables de P.M. más alto y especies de P.M. más bajo (<75 kDa). En condiciones reductoras, la banda principal de ~ 130 kDa se reduce a 2 bandas: ~50 kDa y ~25 kDa, correspondientes a la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. También se observaron patrones de bandas de SDS-PAGE similares con la agrupación de afinidad anti-DsbA (datos no mostrados).

El análisis por HPLC-SEC de la agrupación de anti-DsbA mostró una distribución de un 79 % de pico principal, un 19 % de especies de P.M. más alto y un 2 % de especies de P.M. más bajo. Para la agrupación de anti-DsbC, se observó un 78 % de pico principal, un 16 % de especies de P.M. más alto y un 6 % de especies de P.M. más bajo. Se logró una pureza general del 79 % (pico principal) para esta etapa. Antes de someter a prueba funcionalmente las agrupaciones, se fracciona adicionalmente una parte alícuota de la agrupación para enriquecer la cantidad de pico principal. El rendimiento en el ensayo de las agrupaciones, antes y después de la cromatografía de exclusión por tamaño, se evaluó en el ELISA.

Cromatografía de exclusión por tamaño: SEC

Para obtener un nivel de pureza más alto, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Debido a una cantidad limitada de la agrupación de afinidad anti-DsbA, en primer lugar se fraccionó una parte alícuota de la agrupación de afinidad anti-DsbC. Los parámetros de funcionamiento para la columna de SEC fueron los siguientes. El volumen de la columna fue de 1120 ml y el volumen de carga fue de ≤ 6 ml (≤5 % de 1 VC). La columna se equilibró con PBS-T pH 7,2 para 3 VC s a un caudal de 0,5 ml/min. La carga fue ≤ 6,0 ml por ciclo. Se ejecutó un ciclo para anti-DsbA y se ejecutaron dos ciclos para anti-DsbC. La columna se desarrolló con PBS, pH 7,2 para 1 VC a 0,5 ml/min. Para cada ciclo, se concentró la agrupación de afinidad ajustada por pH del suero de conejo usando un filtro Amicon Ultra de 10 kDa hasta un volumen final de α 6,0 ml.

Se concentró una parte alícuota de 10 mg de la agrupación de afinidad anti-DsbC a un volumen de ≤6,0 ml (≤5 % de 1 VC) usando filtros centrífugos Amicon Ultra-3 (Millipore).

Se cargó la agrupación de afinidad concentrada anti-DsbC en la columna de SEC, y la carga se persiguió con tampón de equilibrado. La columna se desarrolló con tampón de equilibrado y se recogieron fracciones de 2,4 ml (2 % del VC de SEC). Las fracciones de la agrupación del pico principal fueron 34-37.

Se evaluaron varios agrupaciones simuladas en el ensayo por HPLC-SEC para determinar qué serie de fracciones dieron el mayor grado de pureza (tabla 13). Un corte más estrecho (fracciones 35-36) mostró una distribución de un 95,1 % de pico principal, un 1,0 % de PMA y un 3,9 % de especies de PMB, mientras que un corte más amplio (fracciones 34-37) mostró un 93,9 % de pico principal, un 1,4 % de P.M. alto y un 4,7 % de especies de P.M. bajo. Dado que un agrupamiento más estrecho no mejoró significativamente la pureza y tuvo una menor recuperación de la masa de proteínas, se eligió el esquema de agrupamiento más amplio (tabla 13).

Tabla 13. HPLC-SEC de agrupaciones simuladas de anti-DsbC

Esquema de agrupamiento	PMA (%)	Principal/Monómero (%)	PMB (%)	Conc. (mg/ml)	Masa (mg)
1) 34-35	3,7	95,0	1,3	0,39	1,85
2) 34-36	2,2	94,5	3,3	0,49	3,53
3) 35-36	1,0	95,1	3,9	0,62	2,98
4) 34-37	1,4	93,9	4,7	0,52	4,99

Las concentraciones se predicen en base al agrupamiento simulado.

Columna de TSK: QC Pak GFC 300, Caudal = 0,5 ml/min; tiempo de ejecución = 15 min

- 5 La etapa de SEC incrementó la cantidad de monómero de un 79 % (en la etapa de afinidad) a un 94 %. Resultados de pruebas funcionales

10 Las agrupaciones de afinidad anti-DsbC (no fraccionadas y fraccionadas) se evaluaron en el formato ELISA de unión directa para determinar si se requería una mayor pureza para proporcionar un mejor rendimiento del ensayo. Se lograron curvas de respuesta de dosis comparables entre las dos agrupaciones, lo que indica que no fue necesaria la eliminación de las especies de P.M. alto (figura 16).

15 Los resultados anteriores impulsaron la búsqueda de un ensayo ELISA de tipo sándwich más sensible que requiera la conjugación de los anticuerpos frente a DsbC a la peroxidasa de rábano picante (HRP). La conjugación con éxito (biotinilación) de este tipo típicamente requiere que la agrupación de anticuerpos sea baja en especies de P.M. alto (agregados).

20 Para evaluar esta etapa, la agrupación de baja afinidad agregada se conjugó con HRP. Usando la agrupación de baja afinidad agregada como recubrimiento y la agrupación de baja afinidad agregada conjugada a HRP para la detección, la agrupación baja de anti-DsbC agregada se consideró adecuada para su uso en el ELISA de tipo sándwich para detectar DsbC (figura 17).

25 La decisión final fue usar la agrupación de anti-DsbC de Superdex 200 (más baja en agregado, más alto enriquecida en el pico principal). Con esta decisión, la mitad restante de la agrupación de anti-DsbC y toda la agrupación de anti-DsbA se fraccionaron adicionalmente con SEC.

Procedimiento B

30 La etapa de SEC se añadió al procedimiento de purificación final (B) como etapa cromatográfica final para asegurar un mayor grado de pureza con bajos niveles de agregados.

35 El fraccionamiento de la agrupación de afinidad de anti-DsbA y la agrupación de afinidad de anti-DsbC restante se realizó mediante SEC usando una columna Superdex 200 como se describe previamente, y usando los mismos parámetros de funcionamiento descritos anteriormente.

40 Los cortes finales de agrupamiento para anti-DsbA fueron fracciones 35-38 y fracciones 34-37 para anti-DsbC. Estos cortes de agrupamiento se realizaron para obtener altos niveles de pureza (pico principal) y rendimiento máximo del producto. Las agrupaciones fraccionadas finales analizadas por HPLC-SEC contenían un 87,3 % de pico principal (anti-DsbA) y un 92,5 % de pico principal (anti-DsbC). La etapa de SEC tuvo éxito para enriquecer el pico principal eliminando las especies de P.M. alto y bajo e intercambiando el tampón de las agrupaciones en el tampón de formulación final (PBS, pH 7,0 ± 0,2).

La purificación de DsbA y DsbC dio lugar al desarrollo con éxito de ELISA de DsbA y DsbC.

Ejemplo 5. Detección por ELISA de DsbA y DsbC

Reactivos

50 Se diluyeron anticuerpos de recubrimiento (anti-DsbA policlonal o anti-DsbC policlonal) a aproximadamente 1,2 mg/ml con PBS y se conservaron a -60 °C o menos. Después de la descongelación, los anticuerpos de recubrimiento se conservaron a 2-8 °C durante hasta una semana a partir de la fecha de descongelación. Se diluyó material estándar (DsbA o DsbC) a 100 µg/ml y se conservó a -60 °C o menos. La fuente de control del ensayo se diluyó con diluyente de ensayo para que estuviera dentro de las áreas baja y alta respecto a la curva patrón y se conservó a -60 °C o menos. Conjugado a HRP (anticuerpo frente a DsbA o DsbC conjugado a peroxidasa de rábano picante). Después de la descongelación, los anticuerpos conjugados a HRP se conservaron a 2-8 °C durante hasta una semana a partir de la fecha de descongelación. Se diluyó solución madre I de anti-DsbA conjugado a HRP aproximadamente 1:1 con glicerol para conservación a -10 °C a -30 °C. Se diluyó solución madre I de anti-DsbC conjugado a HRP aproximadamente 1:20 con diluyente de ensayo para conservación a -60 °C.

60 Diluyente de ensayo: Cloruro de sodio 0,15 M [NaCl]/fosfato de sodio 0,1 M [NaPO₄]/0,1 % gelatina de pescado/Polisorbato 20 al 0,05 %/Proclin 300 al 0,05 %.

Tampón de lavado: PBS/polisorbato 20 al 0,05 %.

65 Tampón de recubrimiento: Tampón de carbonato de sodio 0,05 M.

Solución de sustrato: Sustrato de peroxidasa para micropocillos SureBlue Reserva™ TMB (Kirkegaard y Perry Labs [KPL], n.º de catálogo 53-00-00 o equivalente).

Solución de parada: Ácido sulfúrico 0,6 N.

Preparación del patrón, control y muestra

Se preparó una curva patrón (1000, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,781, 0 ng/ml). Una parte alícuota de la preparación de control de cada control se descongeló el día de uso. Se descartó el control descongelado no usado. Se diluyeron las muestras de prueba con diluyente de ensayo para que estuvieran dentro del intervalo de la curva patrón.

Procedimiento

Se diluyó solución madre I de anticuerpo de recubrimiento con tampón de recubrimiento para obtener las concentraciones de curva patrón y los intervalos de respuesta deseados. Se pipetearon 100 µl de solución madre de anticuerpo de recubrimiento diluido en cada pocillo de la placa de microvaloración y se incubaron a 2-8 °C durante 12 a 72 horas. Se lavó y aspiró cada pocillo con aproximadamente 400 µl de tampón de lavado 3 veces usando un lavaplaques y se secó a fondo. La solución no se eliminó de los pocillos invirtiendo la placa sobre el depósito de desechos. Se añadieron aproximadamente 200 µl de diluyente de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se repitió la etapa de lavado.

Se pipetearon 100 µl por pocillo de patrones diluidos (por duplicado), controles (por duplicado) y muestras en los pocillos apropiados. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas ± 10 minutos con agitación. Se lavaron los pocillos como se indica anteriormente, se giró la placa y se repitió la etapa de lavado.

La solución madre I de conjugado a HRP se diluyó con diluyente de ensayo para producir un intervalo de DO significativo entre los patrones más altos y más bajos, con el objetivo de un valor de DO máximo de 1,5 - 2,0 DO. Se pipetearon 100 µl de solución madre I de conjugado a HRP diluido a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas ± 10 minutos con agitación. Se lavaron los pocillos como se indica anteriormente, se giró la placa y se repitió la etapa de lavado.

Se pipetearon 100 µl por pocillo de solución de sustrato a los pocillos y se incubaron durante un tiempo suficiente en la oscuridad a temperatura ambiente para permitir el desarrollo óptimo del color de la curva patrón. Se pipetearon 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico 0,6 N.

Se leyeron las DO usando un lector de placas con dos filtros, 450 nm para la absorbancia de detección y 620-630 nm para la absorbancia de referencia (la longitud de onda de referencia era opcional).

Cálculos y análisis de datos

Las concentraciones de la muestra se determinaron mediante el uso de un programa informático de procesamiento de datos con un programa de ajuste de curva logística mínimo de 5 parámetros.

El ELISA se usó para evaluar la eliminación de DsbA y DsbC durante la purificación de un anticuerpo como se describe en el ejemplo 4.

Ejemplo 5. Evaluación de la eliminación de DsbA y DsbC durante la purificación de un anticuerpo monoclonal.

Se produjo MAb1 en células de *E. coli* que sobreexpresaron DsbA y DsbC para ayudar en el plegamiento apropiado y la generación de enlaces disulfuro. En resumen, se lisaron células de *E. coli* que expresan MAb1, DsbA y DsbC y se centrifugaron para clarificar el lisado. A continuación se aplicó el concentrado a una columna MabSelect Sure con proteína A (MSS). Posteriormente se aplicaron las fracciones de MSS eluidas que contenían MAb 1 a cromatografía de modo mixto CaptoAdhere (Capto), cromatografía de intercambio catiónico Poros 50 HS y cromatografía de intercambio aniónico QSFF, todas en modo de unión y elución. A continuación se concentraron las fracciones de QSFF agrupadas que contenían MAb1 y se formularon usando ultrafiltración y diafiltración.

Se sometieron a ensayo fracciones de cada etapa de purificación (concentrado, MSS con proteína A, CaptoAdhere, Poros 50 HS, QSFF, UFDF) para determinar la concentración de proteína, la eliminación de proteínas de *E. coli* como se describe a continuación y la presencia de DsbA y DsbC como se describe en el ejemplo 3. Se obtuvieron resultados para seis series de calificación.

Eliminación de la proteína de la célula huésped (ECP)

El procedimiento de recuperación usado para la purificación de anticuerpos se ha evaluado para su capacidad para reducir el nivel de proteínas de la célula huésped (proteínas de *E. coli* o ECP). La cuantificación de ECP se realizó en

muestras a granel en procedimiento y filtradas usando el ensayo ELISA descrito a continuación. Estos datos demuestran que el procedimiento de recuperación reduce significativamente las ECP en los materiales de anticuerpos clínicos a niveles <50 ng/mg de anticuerpo.

- 5 El ELISA de tipo sándwich multiproducto para proteínas de *E. coli* se usó para cuantificar los niveles de ECP en las muestras de la agrupación. Se inmovilizaron anticuerpos anti-ECP enteros de cabra purificados por afinidad sobre pocillos de placas de microvaloración. Se incubaron diluciones de las muestras de la agrupación en los pocillos, seguido de incubación con anti-ECP enteros de cabra purificados por afinidad conjugado a peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se detectó con diclorhidrato de o-fenilendiamina.
- 10 Se cuantificó la ECP mediante lectura de absorbancia a 490 nm en un lector de placas de microvaloración. Se usó un programa informático de ajuste de curvas para generar la curva patrón y calcular automáticamente la concentración de la muestra. El intervalo de ensayo para el ELISA fue típicamente de 1,56 ng/ml a 50 ng/ml para DsbA y de 1,09 ng/ml a 35 ng/ml para DsbC.

15 Resultados

La cantidad total de proteína encontrada en cada fracción se presenta en la tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones totales de proteínas (mg/ml) de fracciones de purificación.

20

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	1,06	1,05	0,93	0,91	1,05
MSS	12,57	12,57	13,71	12,64	12,47
Capto	6,83	7,06	7,65	6,36	6,29
Poros	6,58	6,44	6,48	5,91	6,25
QSFF	4,34	4,52	4,22	3,85	3,89
UFDF	76,818	77,452	72,07	68,189	67,411

La eliminación de la proteína *E. coli* se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Proteína total de *E. coli* (ng ECP/mg de proteína total) de las fracciones de purificación.

25

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	3761682,4	3829524	4510806	4610109,9	3362492,1
MSS	893,9	928,6	1116	1385	969,7
Capto	63,7	67,6	79,80	77,2	55,9
Poros	14,7	18,3	29,5	20,6	13,7
QSFF	5,1	6,9	10	8	5,8
UFDF	8,7	9,6	13,2	11,1	8,4

La cantidad total de DsbA detectada en cada fracción se presenta en la tabla 16.

Tabla 16. Concentración total de DsbA (ng/ml) de fracciones de purificación.

30

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	132688	169288	156320	152944	150888
MSS	647	607	847	1171	733
Capto	1,68	2,55	4,00	1,61	2,22
Poros	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78
QSFF	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78
UFDF	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78

La cantidad relativa de DsbA en cada fracción se determinó normalizando la DsbA total en cada fracción (tabla 16) para la proteína total en cada fracción (tabla 14). Los resultados del contenido normalizado de DsbA se muestran en

la tabla 17. Los resultados se presentan como ng/ml de concentración de DsbA/proteína.

Tabla 17. Contenido relativo total de DsbA (ng DsbA/mg de proteína total) de las fracciones de purificación.

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	125177,3585	161226,6667	168086,0215	168070,3297	143702,8571
MSS	51,5	48,3	61,8	92,6	58,8
Capto	0,2	0,4	0,5	0,3	0,4
Poros	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
QSFF	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
UFDF	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

5

La cantidad total de DsbC detectada en cada fracción se presenta en la tabla 18.

Tabla 18. Concentración total de DsbC (ng/ml) de fracciones de purificación.

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	223328	283116	179370	218864	232976
MSS	4594	5792	5896	7765	5305
Capto	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09
Poros	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09
QSFF	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09
UFDF	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09	<1,09

10

La cantidad relativa de DsbC en cada fracción se determinó normalizando el DsbC total en cada fracción (tabla 18) para la proteína total en cada fracción (tabla 14). Los resultados del contenido normalizado de DsbC se muestran en la tabla 19. Los resultados se presentan como ng/ml de concentración de DsbA/proteína.

15

Tabla 19. Contenido relativo total de DsbC (ng DsbC/mg de proteína total) de las fracciones de purificación.

Agrupación	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 5	Serie 6
Concentrado	210687	269634	192871	240510	221882
MSS	365	461	430	614	425
Capto	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Poros	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
QSFF	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
UFDF	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015

Los resultados de los ensayos DsbA y DsbC muestran que tanto DsbA como DsbC se eliminan antes de la etapa de ultrafiltración/diafiltración. DsbA se elimina después de la etapa de CaptoAdhere y DsbC se elimina después de la etapa de MabSelect Sure.

20

SECUENCIAS

DsbA de *E. coli*

- 5 Secuencia de aminoácidos: sin secuencia líder

AQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDNVKKKLPEGVKMTKYHVNFMGGDLGKDLTQAWA
VAMALGVEDKVTVPLFEGVQKTQTIRSASDIRDVFINAGIKGEEYDAAWNSFVVKSLVAQQEKAADVQLRGVPAMF
VNGKYQLNPQGMDSNMDV FVQYADTVKYLSEKK (SEQ ID NO:1)

- 10 Secuencia de aminoácidos: con secuencia líder (en negrita)

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDNVKKKLPEGVKMTK
YHVNFMGGDLGKDLTQAWAVAMALGVEDKVTVPLFEGVQKTQTIRSASDIRDVFINAGIKGEEYDAAWNSFVVKSLV
AQQEKAADVQLRGVPAMFVNGKYQLNPQGMDSNMDV FVQYADTVKYLSEKK (SEQ ID NO:5)

- 15 Secuencia de ácido nucleico

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAGCGCATCGGCGGCGCAGTATGAAGATGGTAA
ACAGTACACTACCTGGAAAAACCGGTAGCTGGCGCGCCGCAAGTGCTGGAGTTTCTCTTTCTTCTGCCCCGACT
GCTATCAGTTTGAAGAGTTCTGCATATTTCTGATAATGTGAAGAAAACTGCCGAAGGCGTGAAGATGACTAAA
TACCACGTCAACTTCATGGGTGGTGACCTGGGCAAAGATCTGACTCAGGCATGGGCTGTGGCGATGGCGCTGGGCGT
GGAAGACAAAGTGACTGTTCCGCTGTTTGAAGGCGTACAGAAAAACCAGACCATTCTGTTCTGCTTCTGATATCCGCG
ATGTATTTATCAACGCAGGTATTAAAGGTGAAGAGTACGACGCGGCGTGGAAACAGCTTCGTGGTGAAATCTCTGGTC
GCTCAGCAGGAAAAAGCTGCAGCTGACGTGCAATTCGCTGGCGTTCCGCGCATGTTTGTTAACGGTAAATATCAGCT
GAATCCGCGAGGTATGGATACCAGCAATATGGATGTTTTGTTTACGAGTATGCTGATACAGTGAATATCTGTCCG
AGAAAAATAA
(SEQ ID NO:2)

- 20 DsbC de *E. coli*

Secuencia de aminoácidos: sin secuencia líder

DDAAIQQLAKMGIKSSDIQPAPVAGMKT VLTNSGVLYITDDGKHI IQGPMYDVSGTAPVNVNKMMLLKQLNALEKE
MIVYKAPQEKHVI TVFTDITCGYCHKLHEQMADYNALGITVRYLAFPRQGLDSDAEKEMKAIWCAKDKNAFDDVMA
GKSVAPASCDVDIADHYALGVQLGVSGTPAVVLSNGTLVPGYQPPKEMKEFLDEHQMTSGK

- 25 (SEQ ID NO:3)

Secuencia de aminoácidos: con secuencia líder (en negrita)

MKKGFMLFTLLAASFSGFAQADDAAIQQLAKMGIKSSDIQPAPVAGMKT VLTNSGVLYITDDGKHI IQGP
MYDVSGTAPVNVNKMMLLKQLNALEKEMIVYKAPQEKHVI TVFTDITCGYCHKLHEQMADYNALGITVRY
LAFPRQGLDSDAEKEMKAIWCAKDKNAFDDVMAGKSVAPASCDVDIADHYALGVQLGVSGTPAVVLSNG
TLVPGYQPPKEMKEFLDEHQMTSGK

- 30

(SEQ ID NO:6)

Secuencia de ácido nucleico

ATGAAGAAAGGTTTTATGTTGTTTACTTTGTTAGCGGCGTTTTAGGCTTTGCTCAGGCTGATGACGCGGCAATTCA
ACAAACGTTAGCCAAAATGGGCATCAAAGCAGCGATATTAGCCCGCGCCTGTAGCTGGCATGAAGACAGTTCTGA
CTAACAGCGCGTGTGTACATACCGATGATGGTAAACATATCATTCAGGGGCCAATGTATGACGTTAGTGGCAGC
GCTCCGGTCAATGTACCAATAAGATGCTGTTAAAGCAGTTGAATGCGCTTGAAAAAGAGATGATCGTTTATAAAGC
GCCGACAGAAAAACAGTCATCACCGTGTTTACTGATATTACCTGTGGTTACTGCCACAACTGCATGAGCAAATGG
CAGACTACAACGCGCTGGGGATCACCGTGCGTTATCTTGCTTTCCCGCGCCAGGGGCTGGACAGCGATGCAGAGAAA
GAAATGAAAGCTATCTGGTGTGCGAAAGATAAAAACAAAGCGTTTGATGATGTGATGGCAGGTAAAAGCGTCGACC
AGCCAGTTGCGACGTGGATATTGCCGACCATACGCACTTGGCGTCCAGCTTGGCGTTAGCGGTACTCCGGCAGTTG
TGCTGAGCAATGGCACACTTGTTCGGGTTACAGCCGCCGAAAGAGATGAAAGAATTCTCGACGAACACCAAAAA
ATGACCAGCGGTAAATAA

- 35

(SEQ ID NO:4)

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Marc WONG
Liliana T. YEE
5 Amy LIM
Chris B. FONG
- <120> DsbA Y DsbC ULTRAPURIFICADAS Y PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN Y USO DE LAS MISMAS
- 10 <130> 146392026040
- <140> Aún sin asignar
<141> Simultáneamente con el presente documento
- 15 <150> Documento US 62/129.701
<151> 2015-03-06
- <160> 6
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 189
<212> PRT
25 <213> *E. coli*
- <400> 1
Ala Gln Tyr Glu Asp Gly Lys Gln Tyr Thr Thr Leu Glu Lys Pro Val
1 5 10 15
Ala Gly Ala Pro Gln Val Leu Glu Phe Phe Ser Phe Phe Cys Pro His
20 25 30
Cys Tyr Gln Phe Glu Glu Val Leu His Ile Ser Asp Asn Val Lys Lys
35 40 45
Lys Leu Pro Glu Gly Val Lys Met Thr Lys Tyr His Val Asn Phe Met
50 55 60
Gly Gly Asp Leu Gly Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Ala Val Ala Met
65 70 75 80
Ala Leu Gly Val Glu Asp Lys Val Thr Val Pro Leu Phe Glu Gly Val
85 90 95
Gln Lys Thr Gln Thr Ile Arg Ser Ala Ser Asp Ile Arg Asp Val Phe
100 105 110
Ile Asn Ala Gly Ile Lys Gly Glu Glu Tyr Asp Ala Ala Trp Asn Ser
115 120 125
Phe Val Val Lys Ser Leu Val Ala Gln Gln Glu Lys Ala Ala Ala Asp
130 135 140
Val Gln Leu Arg Gly Val Pro Ala Met Phe Val Asn Gly Lys Tyr Gln
145 150 155 160
Leu Asn Pro Gln Gly Met Asp Thr Ser Asn Met Asp Val Phe Val Gln
165 170 175
Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Tyr Leu Ser Glu Lys Lys
180 185
- 30 <210> 2
<211> 627
<212> ADN
<213> *E. coli*
- 35 <400> 2
atgaaaaaga tttaggctggc gctggctggt ttagtttttag cgttttagcgc atcgccggcg 60
cagtatgaag atggtaaac gtacactacc ctggaaaaac cggtagctgg cgcccgcaa 120
gtcgtggagt tttctctctt ctctctgccc cactgctatc agtttgaaga agttctgcat 180

```

atttctgata atgtgaagaa aaaactgccg gaaggcgtga agatgactaa ataccacgtc 240
aacttcatgg gtggtgacct gggcaaaagt ctgactcagg catgggctgt ggcgatggcg 300
ctgggctgtg aagacaaaagt gactgttccg ctgtttgaag gcgtacagaa aaccacagacc 360
attogttotg ottctgatat cogogatgta tttatcaaog caggtattaa aggtgaagag 420
tacgaogcgg cgtggaacag cttcgtggtg aaatctcttg tcgctcagca ggaaaaagct 480
gcagctgacg tgcaattgog tggcgttccg gcgatgtttg ttaacggtaa atatcagctg 540
aatccgcagg gtatggatac cagcaatatg gatgtttttg ttcagcagta tgctgatata 600
gtgaaatatc tgtccgagaa aaaataa 627

```

<210> 3
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *E. coli*

<400> 3

Asp	Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	Gln	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Gly	Ile	Lys	Ser
1			5					10					15		
Ser	Asp	Ile	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Met	Lys	Thr	Val	Leu	Thr
		20					25					30			
Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Tyr	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Lys	His	Ile	Ile	Gln
		35				40					45				
Gly	Pro	Met	Tyr	Asp	Val	Ser	Gly	Thr	Ala	Pro	Val	Asn	Val	Thr	Asn
	50				55				60						
Lys	Met	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Met	Ile	Val
65				70				75					80		
Tyr	Lys	Ala	Pro	Gln	Glu	Lys	His	Val	Ile	Thr	Val	Phe	Thr	Asp	Ile
		85				90						95			
Thr	Cys	Gly	Tyr	Cys	His	Lys	Leu	His	Glu	Gln	Met	Ala	Asp	Tyr	Asn
		100				105						110			
Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Val	Arg	Tyr	Leu	Ala	Phe	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu
	115				120					125					
Asp	Ser	Asp	Ala	Glu	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Ile	Trp	Cys	Ala	Lys	Asp
	130				135					140					
Lys	Asn	Lys	Ala	Phe	Asp	Asp	Val	Met	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Ala	Pro
145				150				155					160		
Ala	Ser	Cys	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	His	Tyr	Ala	Leu	Gly	Val	Gln
		165				170						175			
Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Thr	Leu
	180					185						190			
Val	Pro	Gly	Tyr	Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Met	Lys	Glu	Phe	Leu	Asp	Glu
	195					200					205				
His	Gln	Lys	Met	Thr	Ser	Gly	Lys								
	210					215									

<210> 4
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> *E. coli*

<400> 4

```

atgaagaaag gttttatggt gtttaactttg ttagcggcgt tttcaggctt tgctcaggct 60
gatgacgcgg caattcaaca aacgttagcc aaaatgggca tcaaaagcag cgatattcag 120
ccgcgcctg tagctggcat gaagacagtt ctgactaaca gcggcgtgtt gtacatcacc 180
gatgatggtg aacatatcat tcaggggcca atgtatgacg ttagtggcac ggctccggtc 240
aatgtcacca ataagatgct gttaaagcag ttgaatgcgc ttgaaaaaga gatgatcgtt 300
tataaagcgc cgcaggaaaa acacgtcatc accgtgttta ctgatattac ctgtggttac 360
tgccacaaac tgcatgagca aatggcagac tacaacgcgc tggggatcac cgtgcgttat 420
cttgcttttc cgcgccaggg gctggacagc gatgcagaga aagaaatgaa agctatctgg 480
tgtgcgaaag ataaaaacaa agcgtttgat gatgtgatgg caggtaaaag cgtgcgacca 540
gccagtttgc acgtggatat tgccgaccat taecgacttg gcgtccagct tggcgttagc 600
ggtactccgg cagttgtgct gagcaatggc acacttgctt cgggttacca gccgccgaaa 660
gagatgaaag aattcctoga cgaacaccaa aaaatgacca gcggtaaata a 711

```

<210> 5
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> *E. coli*

5

<400> 5
 Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Ala Gln Tyr Glu Asp Gly Lys Gln Tyr Thr Thr Leu Glu
 20 25 30
 Lys Pro Val Ala Gly Ala Pro Gln Val Leu Glu Phe Phe Ser Phe Phe
 35 40 45
 Cys Pro His Cys Tyr Gln Phe Glu Glu Val Leu His Ile Ser Asp Asn
 50 55 60
 Val Lys Lys Lys Leu Pro Glu Gly Val Lys Met Thr Lys Tyr His Val
 65 70 75 80
 Asn Phe Met Gly Gly Asp Leu Gly Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Ala
 85 90 95
 Val Ala Met Ala Leu Gly Val Glu Asp Lys Val Thr Val Pro Leu Phe
 100 105 110
 Glu Gly Val Gln Lys Thr Gln Thr Ile Arg Ser Ala Ser Asp Ile Arg
 115 120 125
 Asp Val Phe Ile Asn Ala Gly Ile Lys Gly Glu Glu Tyr Asp Ala Ala
 130 135 140
 Trp Asn Ser Phe Val Val Lys Ser Leu Val Ala Gln Gln Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Asp Val Gln Leu Arg Gly Val Pro Ala Met Phe Val Asn Gly
 165 170 175
 Lys Tyr Gln Leu Asn Pro Gln Gly Met Asp Thr Ser Asn Met Asp Val
 180 185 190
 Phe Val Gln Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Tyr Leu Ser Glu Lys Lys
 195 200 205

<210> 6
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> *E. coli*

10

<400> 6
 Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
 100 105 110
 Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
 115 120 125
 Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
 145 150 155 160
 Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
 165 170 175

15

ES 2 761 726 T3

Ser	Val	Ala	Pro	Ala	Ser	Cys	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	His	Tyr	Ala
			180					185					190		
Leu	Gly	Val	Gln	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ser
		195					200					205			
Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Gly	Tyr	Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Met	Lys	Glu
	210					215					220				
Phe	Leu	Asp	Glu	His	Gln	Lys	Met	Thr	Ser	Gly	Lys				
225					230					235					

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar un polipéptido de disulfuro oxidoreductasa A (DsbA) de un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA, comprendiendo el procedimiento
 - a) añadir polietilenimina (PEI) a una concentración final de un 0,01 % a 1,0 %, preferentemente un 0,1 %, a un lisado celular que comprende el polipéptido de DsbA,
 - b) clarificar el lisado celular mediante centrifugación,
 - c) aplicar el lisado celular clarificado que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio aniónico,
 - d) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio aniónico para generar un eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA,
 - e) aplicar el eluido del intercambio aniónico que comprende el polipéptido de DsbA a un material de cromatografía de intercambio catiónico,
 - f) eluir el polipéptido de DsbA del material de cromatografía de intercambio catiónico para generar un eluido del intercambio catiónico que comprende la DsbA purificada, en el que la DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el lisado clarificado comprende MOPS 10 mM, pH 7,1.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material de cromatografía de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico fuerte, preferentemente una amina cuaternaria, más preferentemente una amina cuaternaria unida a agarosa reticulada.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento comprende uno o más de los siguientes:
 - i) la DsbA se eluye del material de cromatografía de intercambio aniónico con las siguientes etapas:
 - un 15 % de Tris 25 mM y NaCl 250 mM a pH 9,2 para cuatro volúmenes de columna,
 - un 20 % de Tris 25 mM y NaCl 250 mM a pH 9,2 para cuatro volúmenes de columna,
 - un 25 % de Tris 25 mM y NaCl 250 mM a pH 9,2 hasta que se eluya la DsbA de la columna,
 - ii) el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbA de la etapa b) se pasa a través de un filtro de 0,22 µm antes de la cromatografía de intercambio aniónico,
 - iii) el lisado clarificado que comprende el polipéptido de DsbA de la etapa b) se ajusta a pH 9,0 antes de la cromatografía de intercambio aniónico,
 - iv) el eluido del intercambio aniónico se recoge en fracciones,
 - v) se seleccionan las fracciones de intercambio aniónico que comprenden al menos un 55 % de DsbA para su purificación adicional,
 - vi) el eluido del intercambio aniónico de la etapa d) se ajusta a pH 5,0 antes de la cromatografía de intercambio catiónico,
 - vii) se lava el material de cromatografía catiónica de la etapa e) con 5 volúmenes de columna de MES 12,5 mM antes de la elución,
 - viii) se eluye la DsbA del material de cromatografía catiónica de la etapa e) usando un gradiente de sal de un 0 % a 60 % de MES 12,5 mM y NaCl 1 M sobre 15 volúmenes de columna,
 - ix) el eluido del intercambio catiónico se recoge en fracciones, o
 - x) se agrupan fracciones del intercambio catiónico que comprenden al menos un 95 % de DsbA.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las fracciones del eluido del intercambio aniónico de la etapa iv) se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño antes de la cromatografía de intercambio catiónico.

6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, en el que las fracciones del eluido del intercambio catiónico de la etapa ix) se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- 5 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el material de intercambio catiónico comprende un resto sulfopropilo.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el resto sulfopropilo está unido a una matriz de poli(estireno-divinilbenceno) reticulada o equivalentes de la misma.
- 10 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polipéptido de DsbA es un polipéptido de DsbA de *Escherichia coli*.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el polipéptido de DsbA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, o al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
- 15 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la DsbA se expresa en una célula de *E. coli*.
- 20 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la DsbA se expresa en una célula de *E. coli* genomanipulada para expresar DsbA a niveles mayores que la expresión endógena de DsbA.
13. Un procedimiento para purificar anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, que comprende poner en contacto una composición que comprende anticuerpos anti-DsbA con material de cromatografía que comprende DsbA, en el que la DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica, unido a un material de soporte, lavar el material de cromatografía para eliminar compuestos no unidos, y eluir los anticuerpos anti-DsbA, en el que la DsbA se prepara por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 25 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que menos de un 1 % de los anticuerpos se unen específicamente a compuestos distintos de DsbA.
- 30 15. Un procedimiento para cuantificar DsbA en una muestra, que comprende detectar DsbA en la muestra usando un sistema de detección y comparar la cantidad de DsbA detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbA, en el que el patrón de referencia de DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el patrón de referencia de DsbA se prepara mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 40 17. El procedimiento de la reivindicación 15 o 16, en el que el sistema de detección es un inmunoensayo.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, en el que la DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
- 45 19. Un procedimiento para analizar una muestra de polipéptido recombinante para determinar la presencia y/o cantidad de DsbA, que comprende detectar DsbA en la muestra usando un inmunoensayo y comparar la cantidad de DsbA detectada en la muestra con la detección de una o más concentraciones de un patrón de referencia de DsbA, en el que el patrón de referencia de DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
- 50 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el patrón de referencia de DsbA se prepara mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el patrón de referencia de DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
21. El procedimiento de las reivindicaciones 19 o 20, en el que el inmunoensayo comprende anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, en el que la DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
- 55 22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA, en el que la DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica, son anticuerpos policlonales, en el que los anticuerpos se usan como anticuerpos de captura en el inmunoensayo y/o como anticuerpos de detección.
- 60 23. El procedimiento de la reivindicación 21 o 22, en el que los anticuerpos que se unen específicamente a DsbA se preparan de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 13 o 14.
24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el polipéptido recombinante se prepara en una célula huésped.
- 65

25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la célula huésped es una célula de *E. coli*.
26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que la célula de *E. coli* sobreexpresa DsbA.
- 5 27. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la muestra es un producto purificado final de polipéptido recombinante.
28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el producto purificado final de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina.
- 10 29. Un inmunoensayo para detectar DsbA en una muestra, en el que la muestra se obtiene de una preparación de polipéptido recombinante o una línea de células huésped, comprendiendo el procedimiento:
 - 15 (a) poner en contacto un anticuerpo de captura que se une a DsbA con la muestra generando de este modo un material de combinación de muestra-anticuerpo de captura;
 - (b) poner en contacto un anticuerpo de detección que se une a DsbA con el material de combinación de muestra-anticuerpo de captura; y
 - 20 (c) detectar el anticuerpo de detección unido al material de combinación de muestra-anticuerpo de captura, y
 - (d) determinar la cantidad de DsbA presente en la muestra comparando la curva de valoración patrón con una curva de valoración patrón generada con una composición de DsbA, en el que la composición de DsbA comprende al menos un 95 % de polipéptido de DsbA monomérica.
- 25 30. Un ensayo de calidad para una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo el ensayo de liberación someter una muestra de la composición farmacéutica al procedimiento de inmunoensayo de la reivindicación 29, en el que la cantidad de DsbA detectada en la composición determina si la composición farmacéutica es adecuada para su administración a un animal.
- 30 31. El ensayo de calidad de la reivindicación 30, en el que una cantidad de DsbA en la composición farmacéutica de menos de aproximadamente 1 ppm indica que la composición farmacéutica es adecuada para su administración al animal.
- 35 32. El inmunoensayo de la reivindicación 29 o el ensayo de calidad de la reivindicación 30, en el que la célula bacteriana es una célula de *E. coli*.
33. El inmunoensayo de la reivindicación 32, en el que la célula de *E. coli* sobreexpresa DsbA.
- 40 34. El inmunoensayo o ensayo de calidad de la reivindicación 32 o 33, en el que la muestra es lisado celular.
35. El inmunoensayo o ensayo de calidad de las reivindicaciones 32 a 34, en el que la preparación de polipéptido recombinante es un producto purificado final.
- 45 36. El inmunoensayo o ensayo de calidad de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en el que el polipéptido recombinante contenido en la preparación de polipéptido recombinante es un anticuerpo o una inmunoadhesina.
37. El inmunoensayo de ensayo de calidad de la reivindicación 36, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un semianticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 50 38. Un kit para la detección de DsbA en una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante preparado a partir de una célula bacteriana, comprendiendo dicho kit una composición de anticuerpos anti-DsbA de la reivindicación 13 o 14 y una composición que comprende DsbA para su uso como un patrón de referencia, en el que DsbA comprende al menos un 95 % de DsbA monomérica, en la generación de curvas patrón para cuantificar DsbA en una muestra y/o para su uso como controles positivos, en el que la composición que comprende DsbA se prepara de acuerdo con los procedimientos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 55

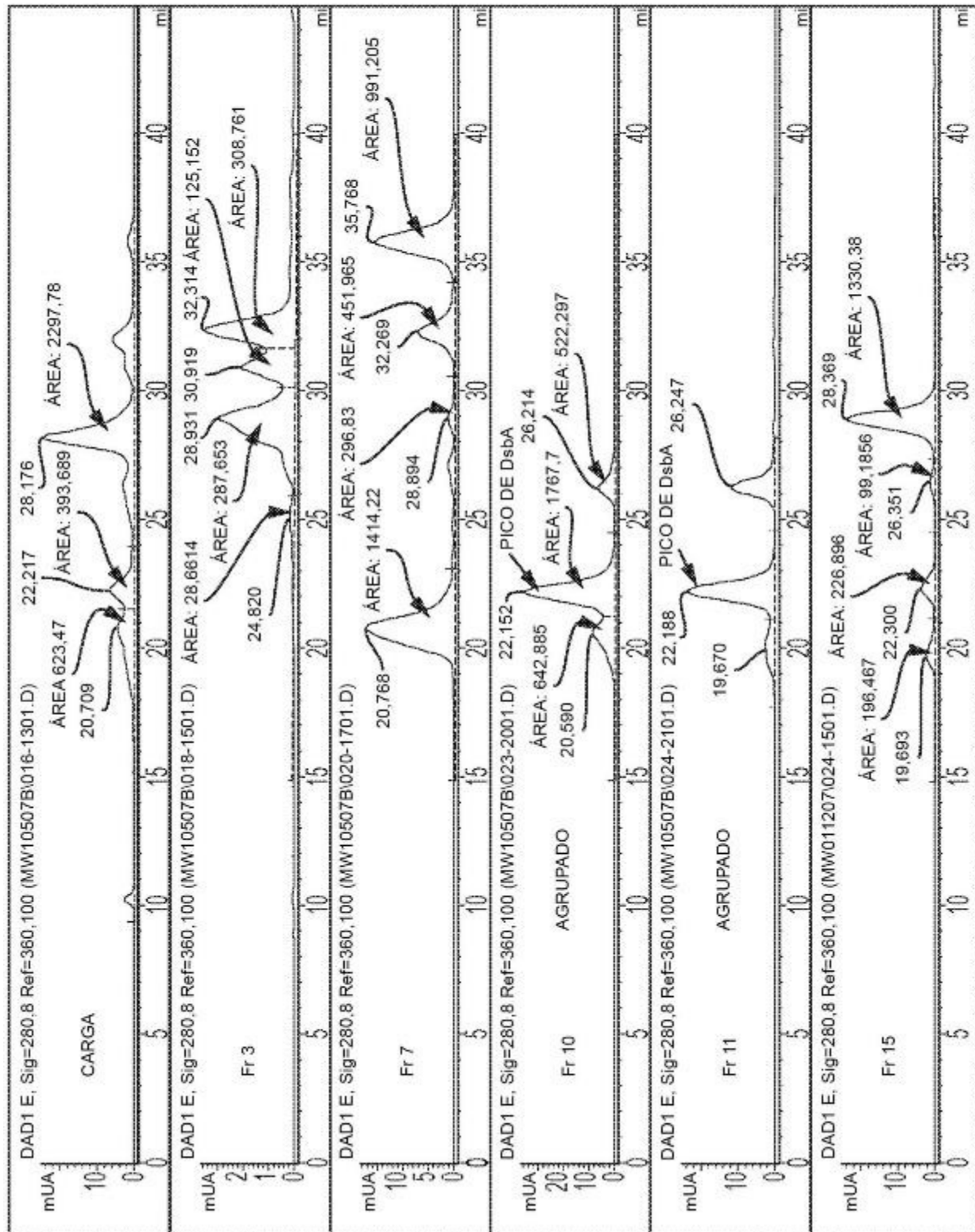


FIG. 1

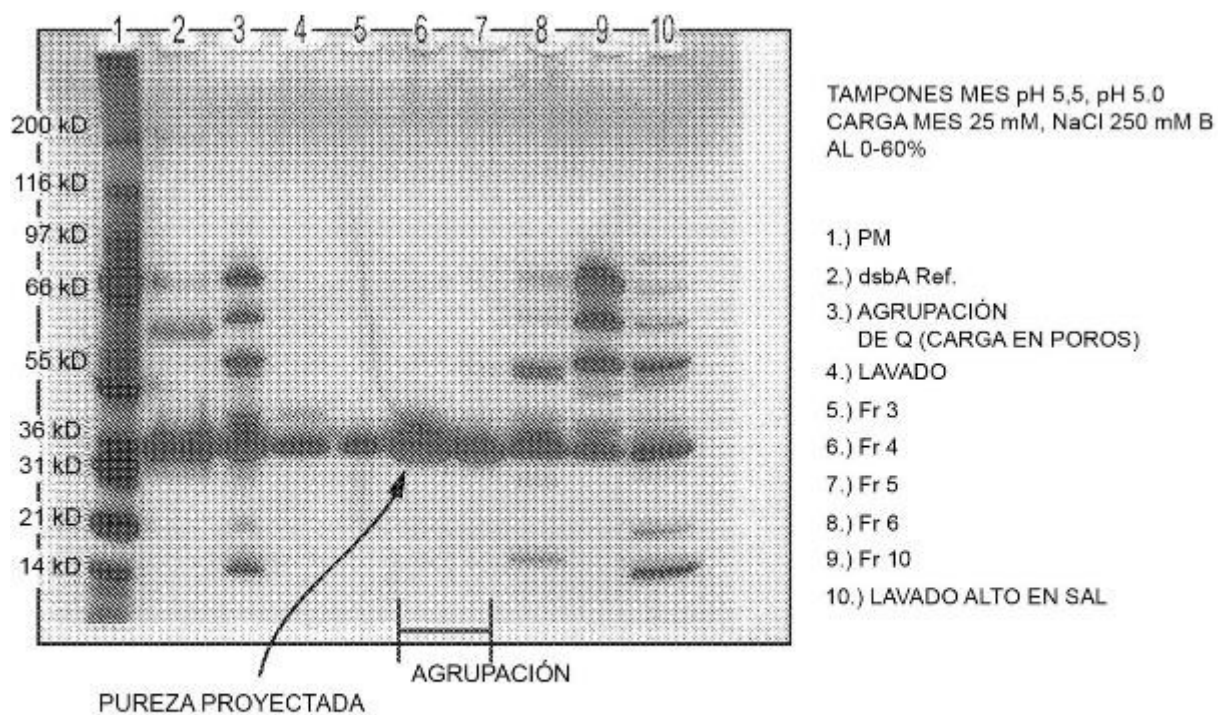


FIG. 2

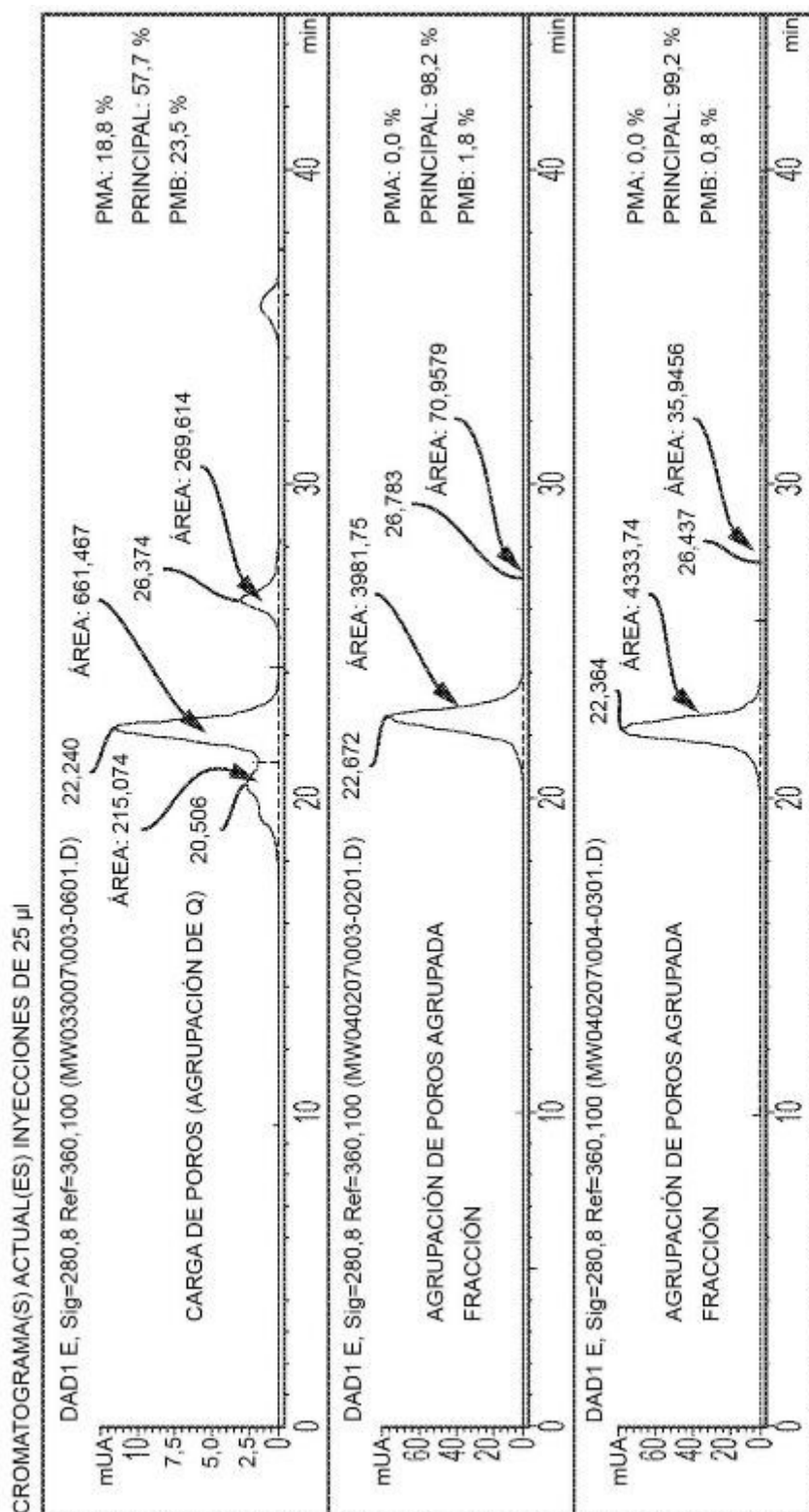
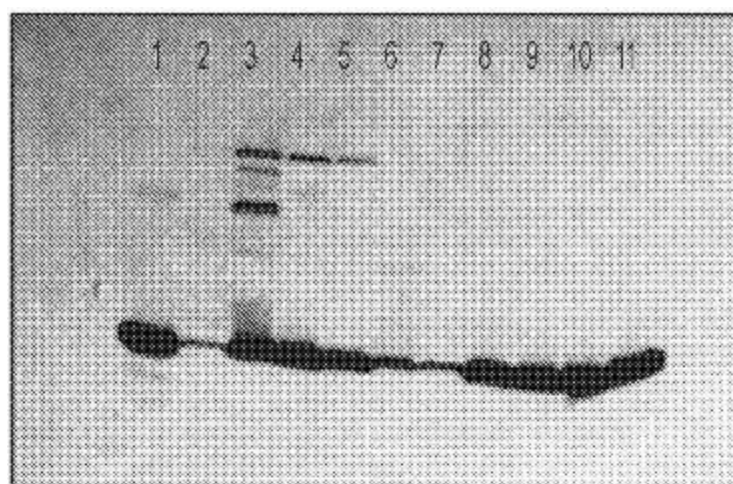


FIG. 3



- 1.) DsbA
- 2.) DsbC
- 3.) CONCENTRADO DE DsbA
- 4.) AGRUPACIÓN DE Q 010507
- 5.) AGRUPACIÓN DE Q AGRUPACIÓN SIMULADA Fr 10-15 010507
- 6.) AGRUPACIÓN DE Q Fr 8 (PICO A 20 MIN)
- 7.) POROS Fr 8
- 8.) POROS Fr 13
- 9.) POROS Fr 14
- 10.) POROS Fr 15
- 11.) PICO DE ELUCIÓN PRINCIPAL DE POROS 11-15 (AGRUPACIÓN SIMULADA)

FIG. 4

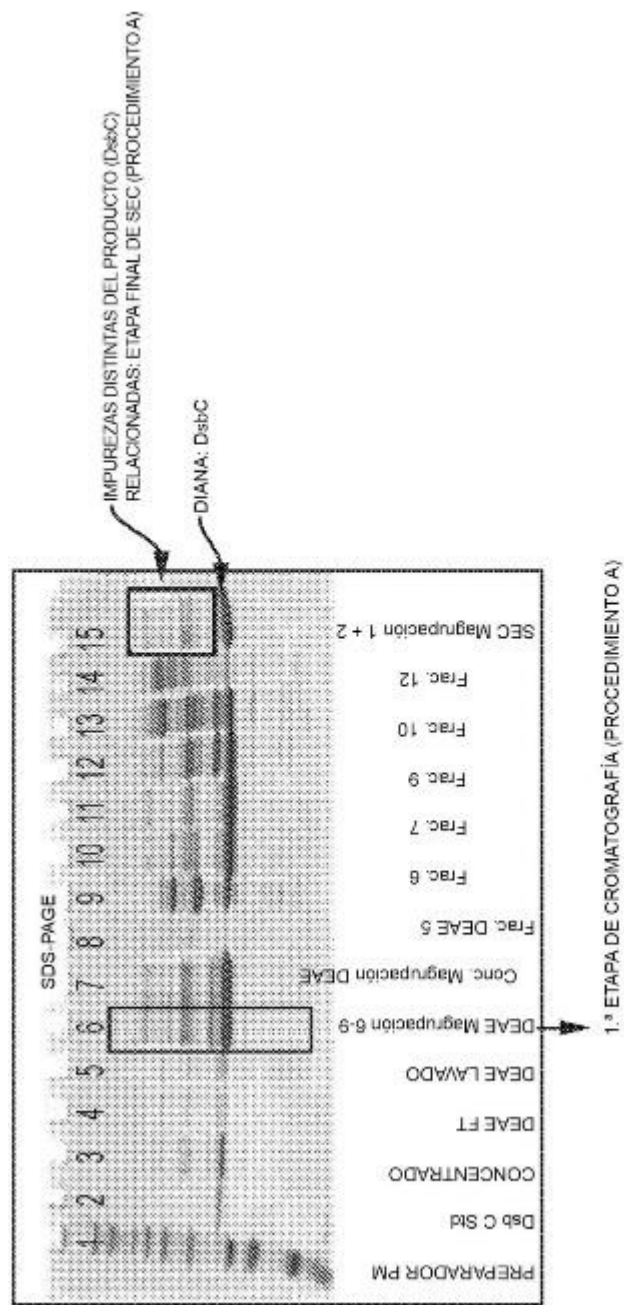


FIG. 5

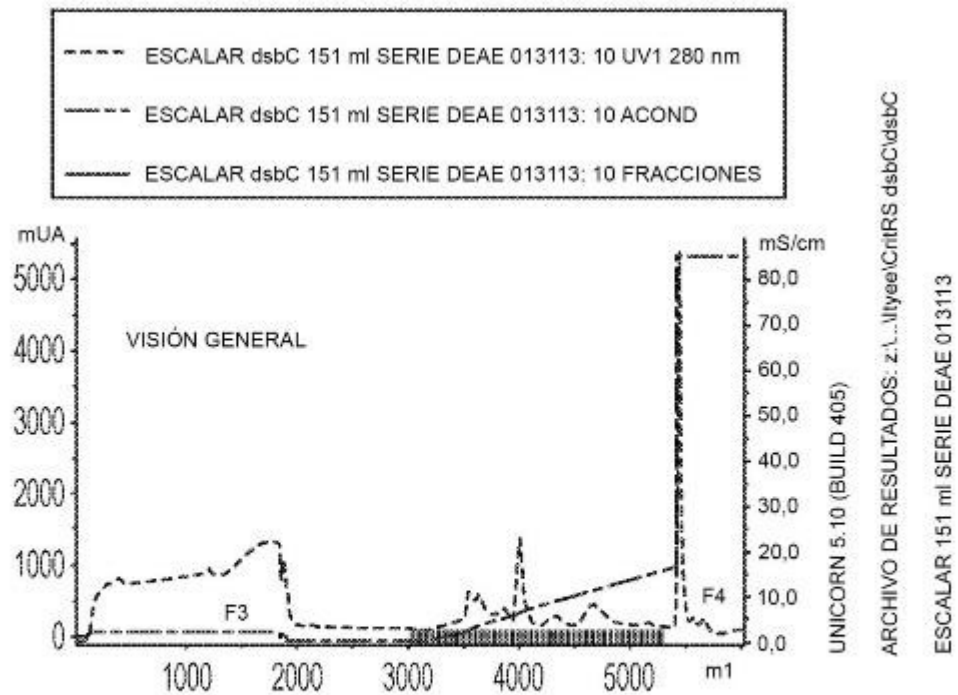


FIG. 6A

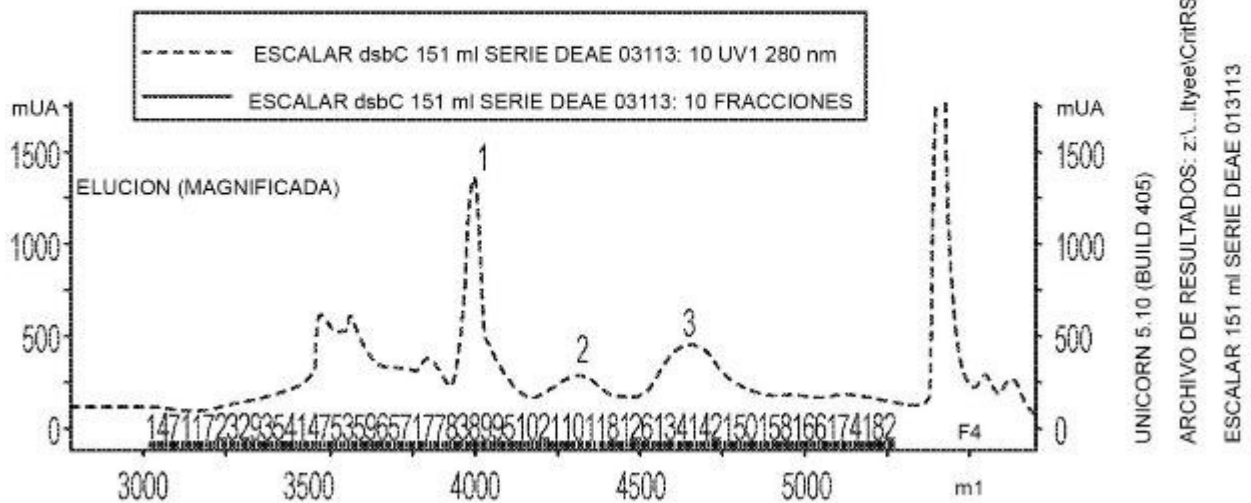


FIG. 6B

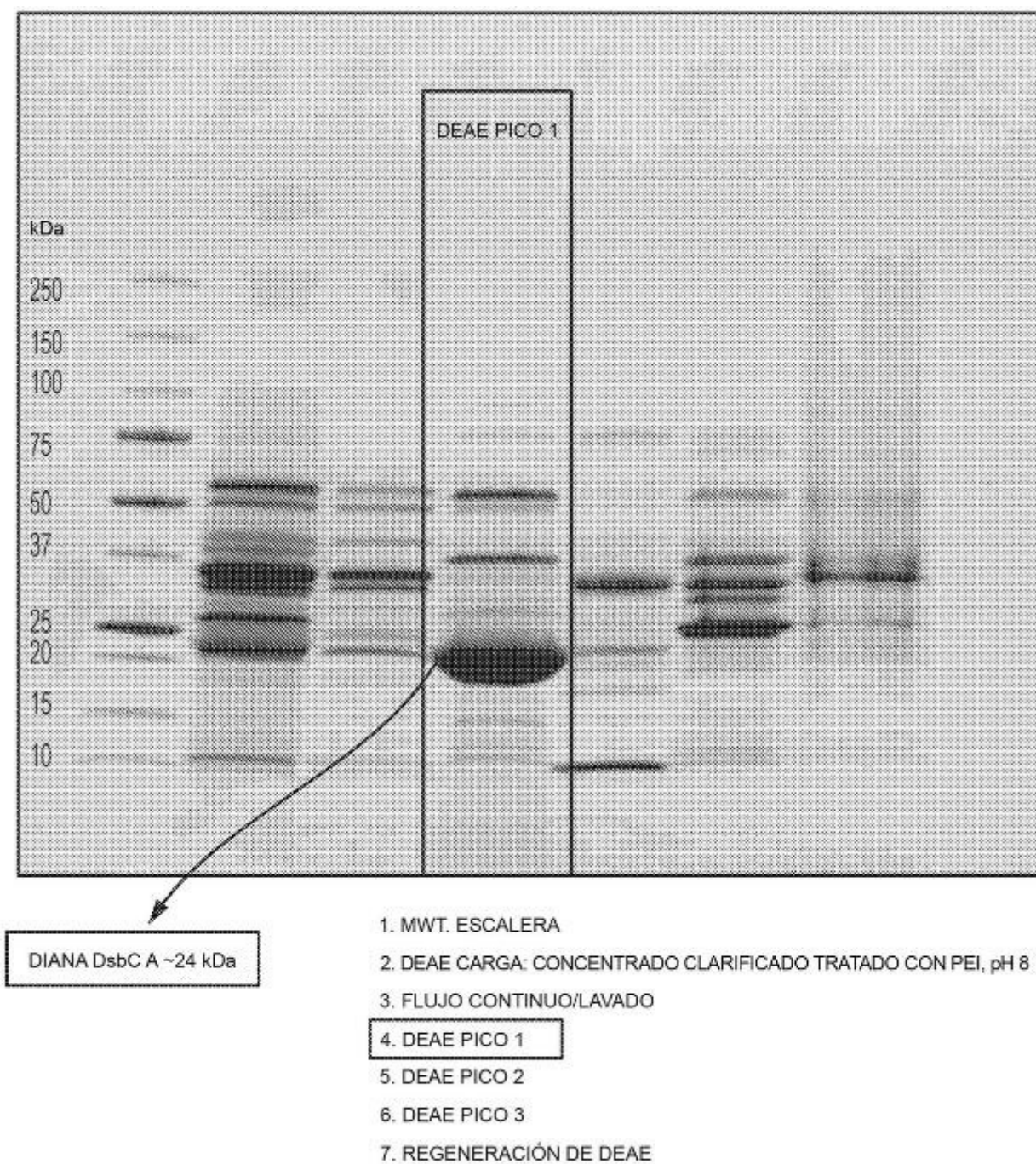


FIG. 7

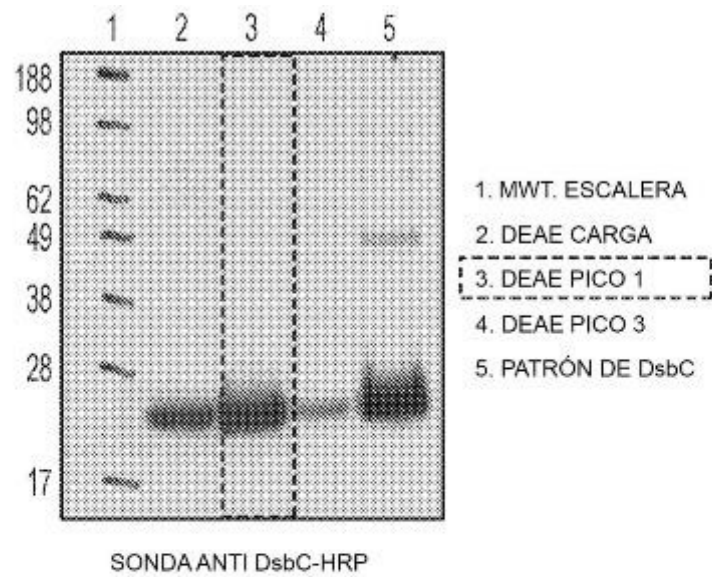


FIG. 8A

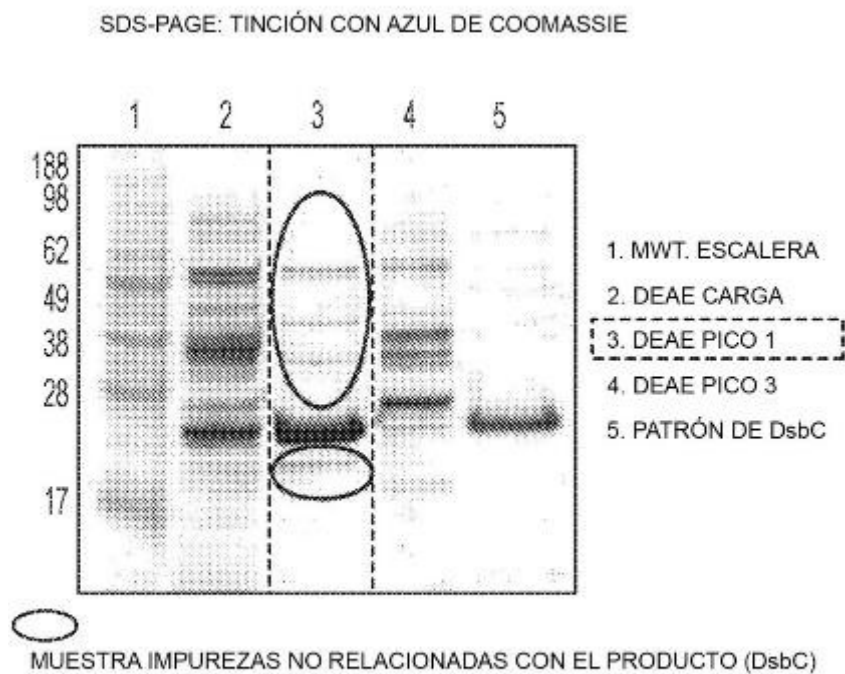


FIG. 8B

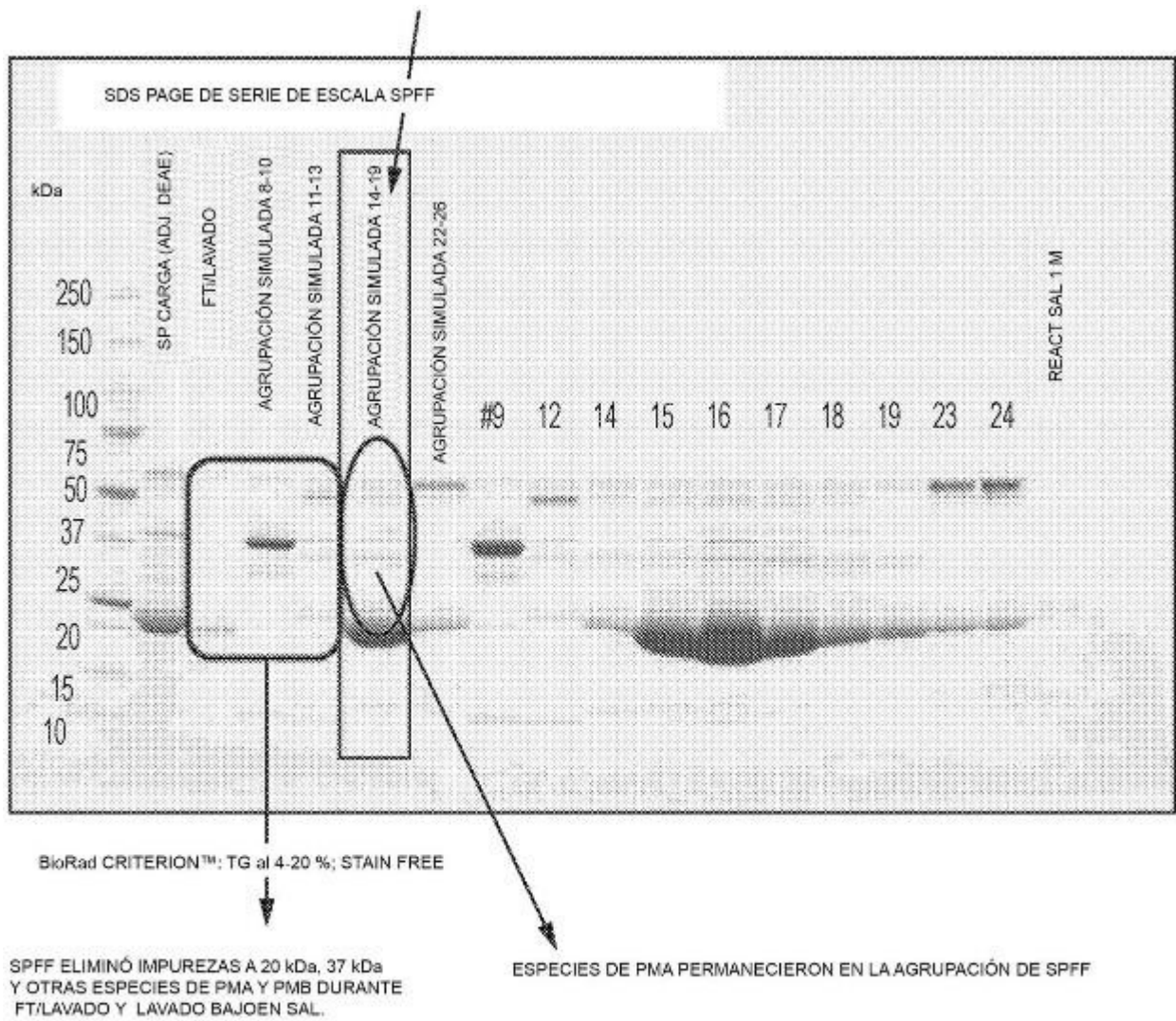


FIG. 9

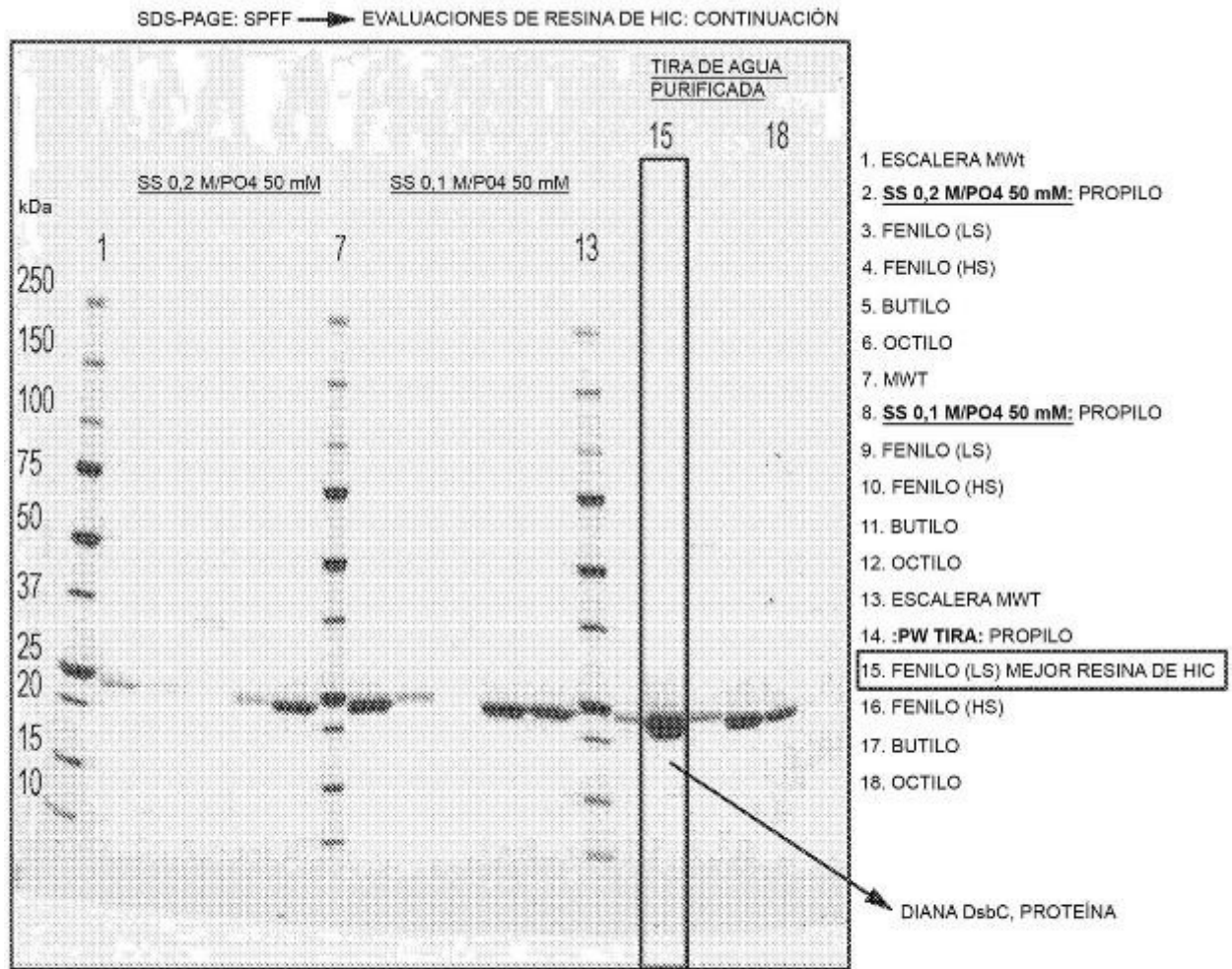
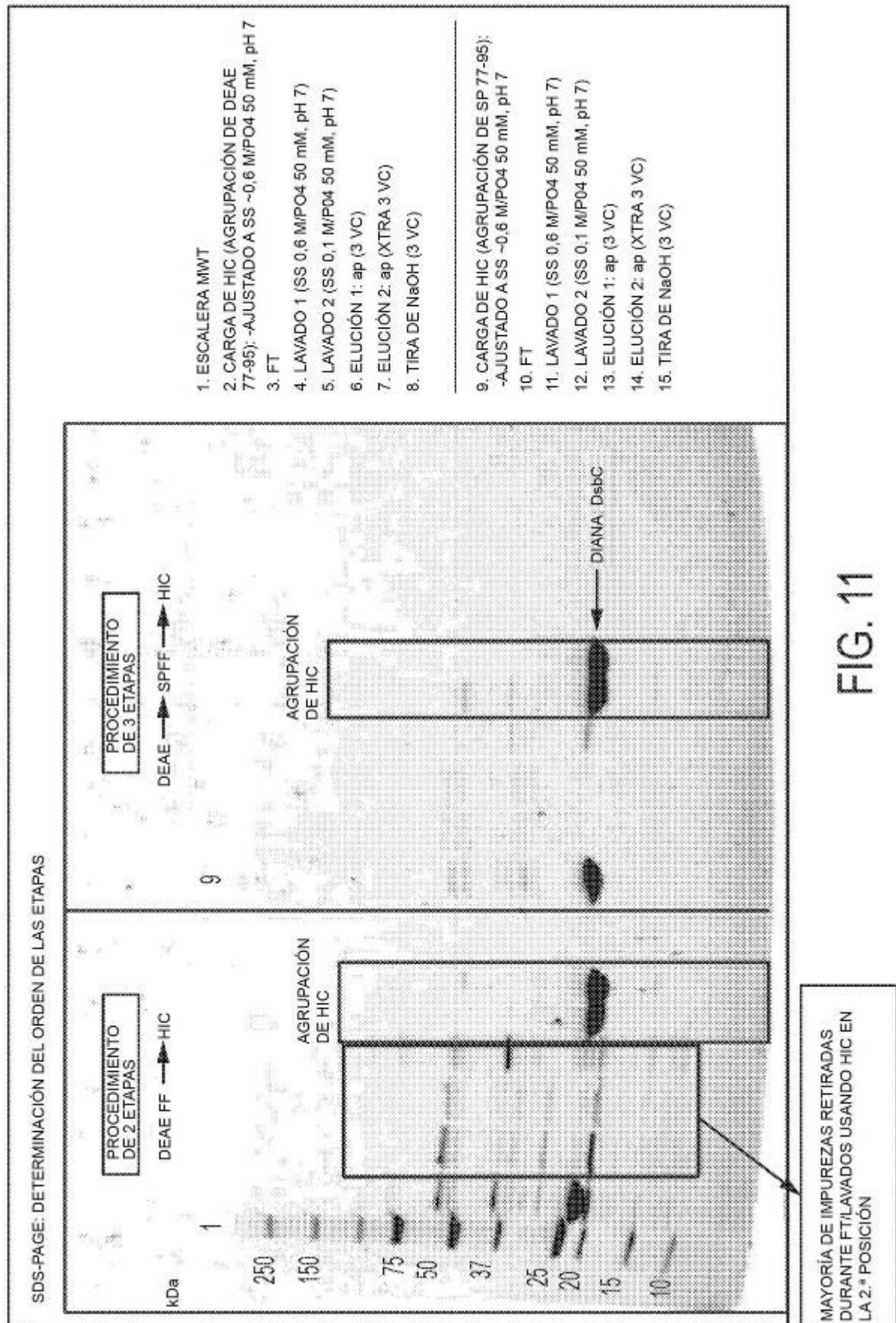


FIG. 10



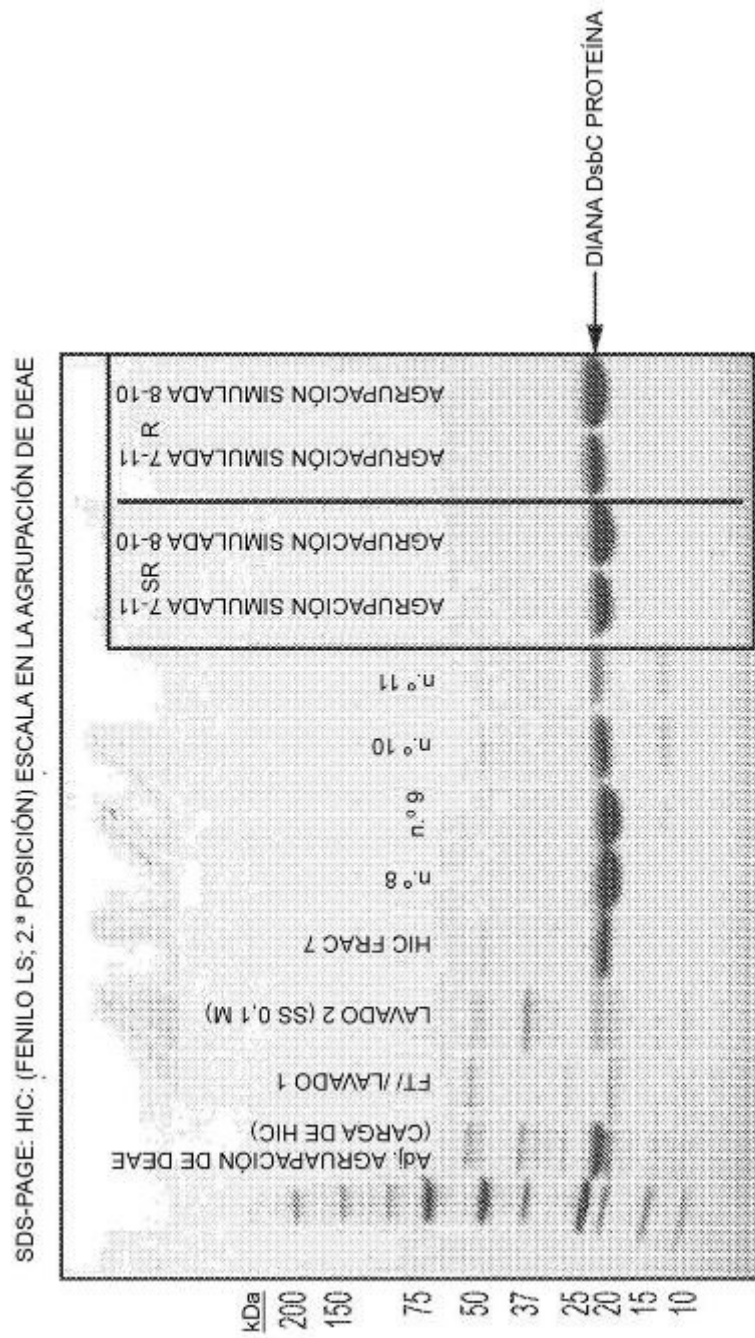


FIG. 12

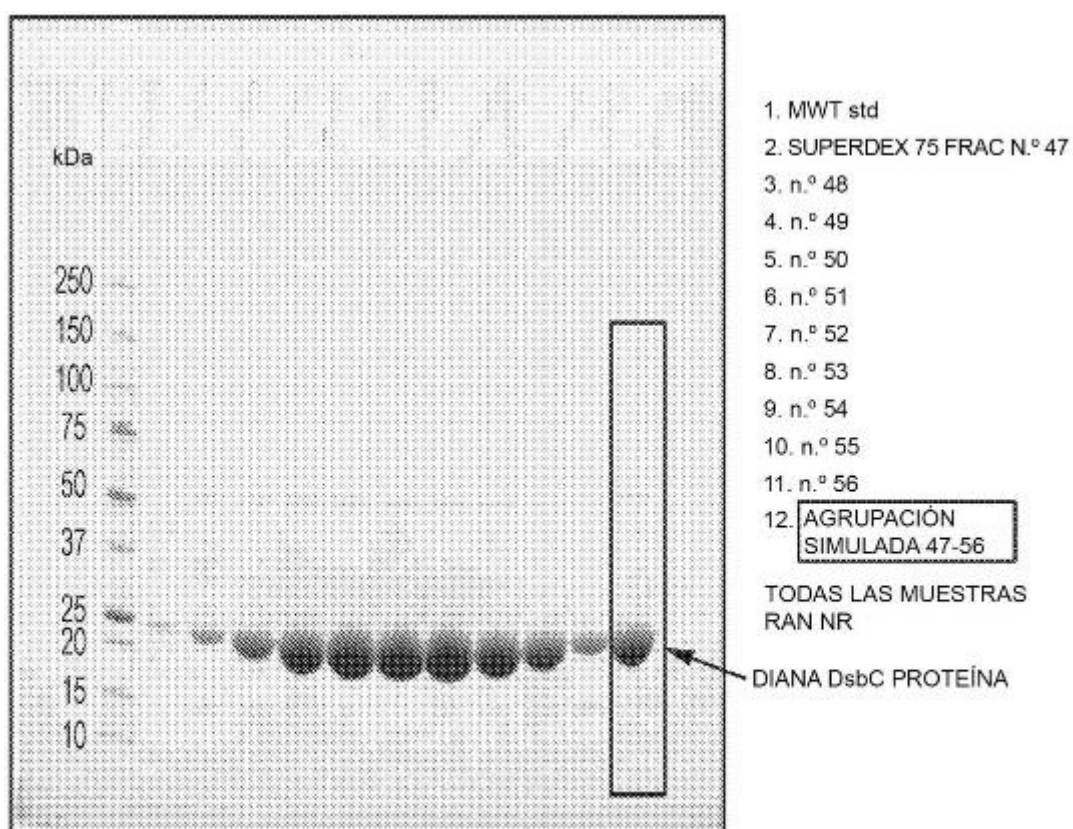


FIG. 13

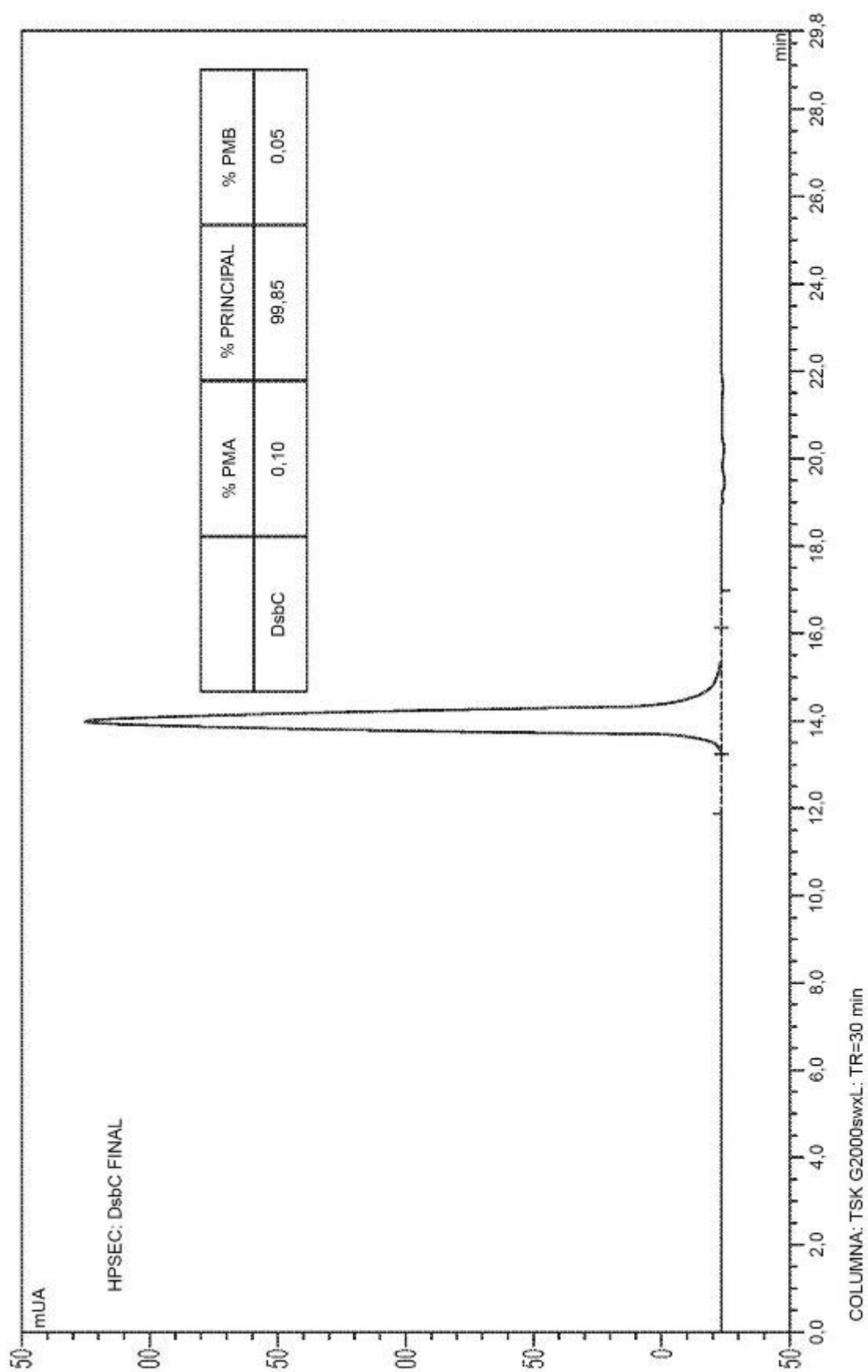


FIG. 14

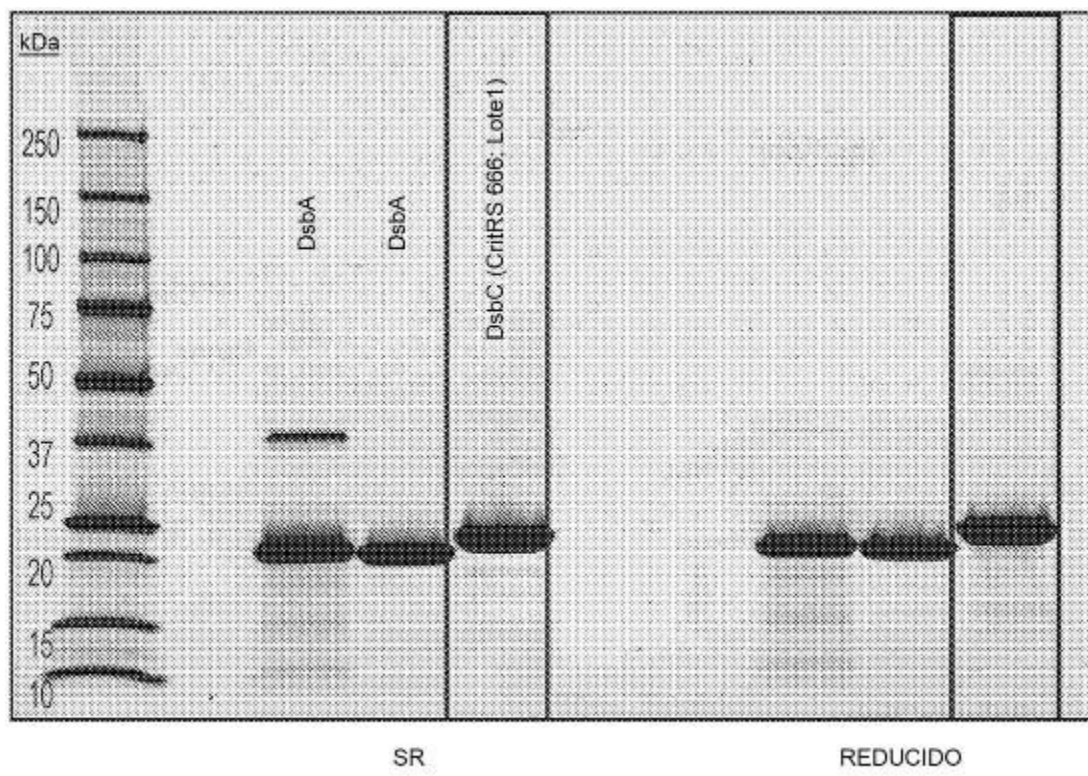
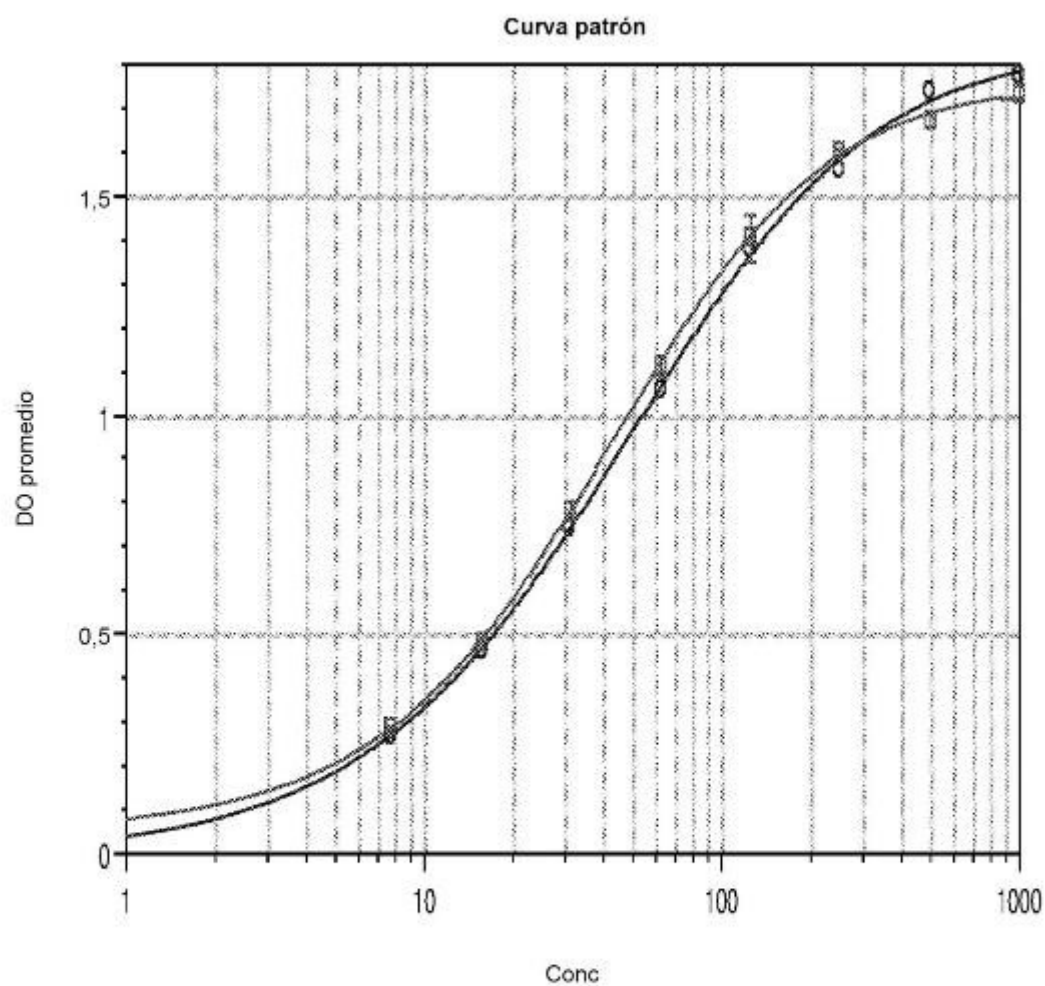


FIG. 15

FIG. 16



Ajuste 5-P: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B)^G + D$:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>R²</u>
○ STD (aDsbC (Agr): Conc frente a DO prom)	-0,0102	0,935	71,7	1,84	1,37	0,999
□ STD2 (aDsbC (Mono): Conc frente a DO prom)	0,047	1,07	55,8	1,76	1,3	1

Opción de ajuste de curva: valor de peso fijo

FIG. 17

