

5

10

Antecedentes de la Invención

15

25

pesado variable (VH) en donde los dominios variables no están en su estado natural de estar unidos en el C-terminal al dominio ligero constante (CL) o al dominio pesado constante (CH1). En una molécula del anticuerpo entera que
5 está presente de manera natural, la presencia de los dominios CL y CH1 actúa para estabilizar la formación de pares del VL y del VH. De acuerdo con esto, en la ausencia de los dominios CL y CH1, los dominios variables son propensos a un intercambio dinámico con los dominios
10 variables de las moléculas adyacentes. Una manera de detener este proceso dinámico es por la introducción de un enlace de disulfuro entre el VH y el VL, el cual fija descendientemente la formación de pares de la región v y evita el intercambio dinámico. Sin embargo, la presencia del enlace de disulfuro
15 también puede actuar para estabilizar los multímeros no deseados del anticuerpo.

Los formatos de anticuerpos novedosos también comprenden frecuentemente enlazadores. Sin embargo, la presencia de los enlazadores puede conducir a la formación de
20 multímeros no deseados cuando el dominio variable en una molécula forma un par con un dominio variable en otra molécula uniendo por esto las dos moléculas conjuntamente. La presencia de un enlace de disulfuro en la Fv actúa entonces para estabilizar las especies multiméricas.

25 Un ejemplo de un formato de anticuerpo biespecífico

conocido son los anticuerpos del Fab-dsFv como se describe con detalle en WO2010/035012 y WO2011/036460. Este formato de anticuerpo tiene la propensión a formar multímeros que comprenden dos o más monómeros, como se muestra en la figura

5 9. Las especies multiméricas semejantes también están presentes en las composiciones que comprenden moléculas de scFv unidas al disulfuro en donde el VH de scFv forma un par con el VL de scFv separada para formar el par de Fv estabilizado con disulfuro que une dos moléculas de scFv
10 conjuntamente, conduciendo a un dímero de dos scFv. Los pares adicionales de dominios variables en moléculas separadas pueden crear especies multiméricas más grandes.

Los métodos de purificación conocidos, tales como la cromatografía, son capaces de separar especies
15 multiméricas grandes de especies monoméricas más pequeñas pero inevitablemente conducen a un rendimiento total más bajo del anticuerpo. De acuerdo con esto, para los formatos de anticuerpos biespecíficos existe una gran necesidad de métodos para resolver el problema de las especies
20 multiméricas no deseadas en las composiciones del anticuerpo.

Breve Descripción de la Invención

El método de la presente descripción proporciona una solución al problema anterior por medio de la reducción de la cantidad de multímero en las composiciones que
25 comprenden moléculas del anticuerpo. La presente descripción

es especialmente útil para proporcionar composiciones de las moléculas del anticuerpo monoclonales monoméricas adecuadas para el uso humano.

Por consiguiente, se proporciona un método para
5 aumentar el porcentaje del monómero en una composición de moléculas del anticuerpo expresadas de manera recombinante, caracterizado porque la molécula del anticuerpo comprende al menos un Fv con especificidad hacia un antígeno de interés que comprende un VH y un VL, en donde el VH y el VL están
10 conectados directa o indirectamente por medio de uno o más enlazadores y son estabilizados por medio de un enlace de disulfuro entre los mismos, el método comprende:

a) una etapa de conversión térmica manteniendo la composición que comprende la molécula del anticuerpo a una
15 temperatura en el intervalo de 30 a 60 °C durante un periodo de al menos 1 hora;

b) en donde la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de un agente reductor o después del tratamiento con un agente reductor.

20 La utilización del proceso descrito aquí para la molécula del anticuerpo expresada de manera recombinante aumenta ventajosamente la cantidad de monómero en la composición. Además, el método aquí puede ser empleado fácil y rentablemente a una escala comercial.

25 El método de la presente invención es capaz de

convertir especies multiméricas en monómeros, aumentando por esto el porcentaje del monómero. La etapa de conversión permite ventajosamente que el agente reductor reduzca el enlace de disulfuro entre el VH y el VL y las especies multiméricas para desnaturalizar parcialmente y desensamblar por esto los multímeros. El método también permite que los dominios VH y VL formen pares Fv dentro de las moléculas del anticuerpo únicas y la reformación del enlace de disulfuro estabilizador entre el VH y el VL conduciendo a los monómeros. Los inventores han mostrado sorprendentemente que la etapa de conversión y el agente reductor pueden ser utilizados para convertir los multímeros del anticuerpo a monómeros del anticuerpo sin desnaturalizar totalmente el anticuerpo. El método de la presente invención también muestra ventajosamente que los enlaces de disulfuro correctos sean reformados para producir los monómeros deseados.

En una modalidad, el aumento en la concentración del monómero es de 2, 3, 4 veces o más. El método de la presente invención proporciona preferentemente una composición del anticuerpo recombinante después de la etapa de conversión que comprende al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o al menos 90 % del anticuerpo en forma monomérica.

En una modalidad la presente descripción se extiende a un anticuerpo o fragmento de unión obtenido o que

se puede obtener a partir del método descrito aquí.

La invención también proporciona el uso de la composición obtenida a partir del método descrito aquí para su uso en el tratamiento.

5

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra la SDS-PAGE no reductora del anticuerpo A26 Fab-645dsFv purificado de proteína la A tratada con beta-mercaptanoetanol 50 mM a 50 °C, es decir, en donde el tratamiento se realizó después de la purificación con la proteína A.

10

La figura 2 muestra la reducción de SDS-PAGE del anticuerpo A26 Fab-645dsFv purificado con la proteína A tratado con beta-mercaptanoetanol 50 mM a 50 °C, es decir, en donde el tratamiento se realizó después de la purificación con la proteína A.

15

La figura 3 muestra el análisis de SEC-HPLC del porcentaje del monómero obtenido para el anticuerpo A26 Fab-645dsFv tratado con beta-mercaptanoetanol 50 mM a temperaturas en el intervalo de 37 a 60 °C.

20

La figura 4 muestra el rendimiento pronosticado del monómero obtenido después del tratamiento como un porcentaje del rendimiento total de la proteína objetivo inicial antes del tratamiento. El rendimiento pronosticado como se emplea aquí es el rendimiento del monómero como porcentaje en referencia al rendimiento de inicio antes del tratamiento.

25

La figura 5 muestra el análisis de SEC-HPLC de la recuperación neta del monómero del anticuerpo A26 Fab-645dsFv durante el transcurso del tiempo cuando se trata con beta-mercaptanoetanol 50 mM a temperaturas en el intervalo de 37 a 5 60 °C.

La figura 6 muestra el análisis de SEC-HPLC de la recuperación neta del monómero del anticuerpo A26 Fab-645dsFv durante el transcurso del tiempo cuando se trata con concentraciones de beta-mercaptanoetanol en el intervalo de 1 10 a 50 mM a temperaturas de 50 °C.

La figura 7 muestra el rendimiento previsto del monómero obtenido después del tratamiento como un porcentaje del rendimiento total de la proteína objetivo inicial antes del tratamiento.

15 La figura 8 muestra el análisis del proceso mediante SEC-HPLC (G3000) que determina la recuperación neta del monómero A26Fab-645dsFv durante la conversión a 50 °C a la concentración de bMEA establecida.

20 La figura 9 muestra el cromatograma de SEC-HPLC que muestra la purificación con la proteína A del sobrenadante a partir de la expresión del anticuerpo recombinante A26 Fab-645dsFv, que no ha sido sujeto al tratamiento que emplea el método de la presente descripción.

25 La figura 10 muestra el cromatograma de SEC-HPLC que muestra la purificación con la proteína A del

sobrenadante a partir de la expresión del anticuerpo recombinante A26 Fab-645dsFv, tratado con beta-mercaptanoetanol 50 mM a 50 °C.

La figura 11 muestra un análisis de SDS-PAGE no
5 reducido de A26Fab-645dsFv en donde el sobrenadante aclarado se trató con bMEA 50Mm a 50 °C antes de la purificación con la proteína A.

La figura 12 muestra un análisis de SDS-PAGE
reducido de A26Fab-645dsFv en donde el sobrenadante aclarado
10 se trató con bMEA 50Mm a 50 °C seguido por purificación de proteína A.

Las figuras 13 y 14 muestran el análisis de SEC-HPLC para el material del anticuerpo post-procesamiento, con y sin los métodos descritos en este documento. Estas figuras
15 muestran que el material obtenido utilizando los dos procesos proporciona un material comparable.

La figura 15 muestra una página de SDS no reductora para el anticuerpo A26Fab-645dsFv tratado con diversos excipientes.

20 Las figuras 16a y 16b muestran los datos de cromatografía por exclusión de tamaño para A26Fab-645dsFv después del procesamiento en diferentes condiciones.

La figura 17a muestra el porcentaje del monómero después del tratamiento con un agente reductor a temperatura
25 ambiente.

La figura 17b muestra el porcentaje del monómero después del tratamiento con un agente reductor durante 2 horas a 50 °C.

La figura 18a muestra el porcentaje del monómero
5 analizado por SE-HPLC después del tratamiento con un agente reductor a temperatura ambiente.

La figura 18b muestra el porcentaje del monómero como se analizó por SE-HPLC después del tratamiento con un agente reductor durante 2 horas a 50 °C.

10 Las figuras 19a - 26g muestran varias secuencias de moléculas de anticuerpos y sus componentes.

La figura 27 muestra un Fab-dsFv monomérico y versiones multiméricas de Fab-dsFv.

La figura 28 muestra ejemplos de formatos de
15 anticuerpos.

La figura 29 muestra ejemplos de formatos de anticuerpos.

Descripción Detallada de la Invención

El término multímeros o forma multimérica como
20 cuando se utilicen aquí se refieren a las formas del anticuerpo que consisten de los dominios de dos o más monómeros del anticuerpo en los cuales la totalidad de los dominios están plegados y forman pares correctamente. A manera de ejemplo, se pueden formar multímeros a partir de
25 dos o más monómeros del anticuerpo en donde cada dominio VH

forma un par con un dominio VL para formar una región Fv complementaria, tal como se muestra para un Fab-dsFv en la figura 27.

En una modalidad, el aumento del porcentaje del monómero como se emplea aquí se refiere a la obtención de un valor numérico de la molécula del anticuerpo monomérico que es un porcentaje más alto del rendimiento de la proteína objetivo total comparado con el porcentaje de la molécula del anticuerpo del monómero obtenido antes de que el proceso de la presente descripción sea aplicado. Por ejemplo, el porcentaje del monómero puede ser al menos 30 % de rendimiento inicial de las moléculas del anticuerpo y después de aplicar el presente proceso el porcentaje del monómero puede ser al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 % o al menos 90 %. En una modalidad, el valor numérico absoluto, es decir el rendimiento del monómero aislado, es mayor después de llevar a cabo el proceso de la presente descripción.

El rendimiento o la proteína total como se emplean aquí se refieren al valor combinado de las especies de la molécula del anticuerpo en la composición. En una modalidad, el valor del rendimiento empleado es el valor antes del procesamiento de acuerdo con la presente descripción.

En una modalidad, el valor del rendimiento empleado es la cantidad de la proteína total (especies de la molécula

del anticuerpo) recuperada después de llevar a cabo el proceso de acuerdo con la presente descripción.

La proteína total (especies de la molécula del anticuerpo) recuperada después de llevar a cabo el proceso de la presente descripción será reducida a causa de que el procesamiento inevitablemente conduce a algunas pérdidas.

La proteína objetivo se refiere a la molécula del anticuerpo recombinante que es expresada.

La proteína recombinante es una proteína, tal como una molécula del anticuerpo expresada empleando técnicas recombinantes.

A menos que el contexto lo indique de otra manera, la concentración del anticuerpo como se emplea aquí, también referida como concentración de la alimentación, se refiere a un material que comprende la proteína objetivo y los multímeros de la misma, la concentración de todas las especies de anticuerpos incluyendo monómeros y multímeros. En una modalidad, la concentración del anticuerpo es la concentración del anticuerpo en la composición después de una etapa de purificación con la proteína A para eliminar las impurezas de la composición.

En la etapa a) del método de la presente invención, la conversión térmica se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 30 a 60 °C. En una modalidad, la temperatura está en el intervalo de 35 a 60 °C, 40 a 60 °C, 45 a 55 °C,

45 a 50 °C, 50 a 55 °C, 48 a 52 °C, 49 a 51 °C tal como 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 50.5 °C, 51 °C, 51.5 °C, 52 °C, 52.5 °C, 53 °C, 53.5 °C, 54 °C, 54.5 °C y 55 °C. En una modalidad, la temperatura en la etapa a) se realiza a 46, 47,
5 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 °C, tal como aproximadamente 50 °C.

Una temperatura en el intervalo tal como se emplea aquí no significa necesariamente que la composición se mantenga a la misma temperatura durante la duración del
10 proceso, sin embargo, la composición se mantiene generalmente a una o más temperaturas en el intervalo establecido, durante el período durante el cual la composición se realiza la etapa relevante del método. Si y cuando, la temperatura se desplace o cambie fuera del intervalo durante el tratamiento, el
15 controlador efectuará los pasos necesarios para que la composición alcance el intervalo deseado.

El período durante el cual se mantiene la composición del anticuerpo a una temperatura en el intervalo según la presente descripción, está en una modalidad en el
20 intervalo de 1 a 70 horas, por ejemplo de 2 a 60 horas, tal como de 3 a 50 horas, de 3 a 10 horas, de 4 a 6 horas, de 4.5 a 5.5 horas, en particular 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 horas. En una modalidad, el período es de alrededor de 5 horas.

25 El agente reductor tal como se emplea aquí se

refiere a un agente reductor capaz de reducir un enlace de disulfuro en la molécula en cuestión, tal como el anticuerpo. El agente reductor en la presencia de un anticuerpo que comprende uno o más enlaces de disulfuro tiene la capacidad, en las condiciones apropiadas, de reducir el enlace de disulfuro, por ejemplo, a una forma de -SH. En una modalidad, el agente reductor por sí mismo comprende un solo grupo de tiol, dos grupos de tiol o tres o más grupos de tiol. Alternativamente, el agente reductor no comprende un grupo de tiol por sí mismo.

El tiol como se emplea aquí se refiere a un grupo que comprende la entidad -SH.

En una modalidad, el agente reductor se selecciona del grupo que comprende: glutatión (GSH), sulfito de etileno, 2-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetilamina incluyendo las sales de los mismos tales como el clorhidrato (también denominado BMEA, bMEA o B-mea, β -mea o mea), cisteína, como cisteína-HCl, ácido fosforoso y ditioneitol (DTT), TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), THP (tris(hidroxipropil)fosfina).

En una modalidad, el agente reductor comprende un único grupo de tiol. Ventajosamente, si se emplea un agente reductor que comprende un solo tiol, el enlace de disulfuro deseado entre las regiones variables de los monómeros forma naturalmente, es decir, con la necesidad de realizar una

etapa de oxidación específica. Los ejemplos de agentes reductores que comprenden un único grupo tiol incluyen, pero no se limitan a, glutatión, mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

En una modalidad, el agente reductor de tiol es el mercaptoetanol (tal como el 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como la 2-mercaptoetilamina), y en particular la 2-mercaptoetilamina (también denominada BMEA, bMEA o B-mea, β -mea o β mea).

En una modalidad, el agente reductor se agrega antes de que la composición del anticuerpo esté en el intervalo de temperatura de la presente descripción. En una modalidad, la etapa a) se realiza después del tratamiento con un agente reductor, en particular en el que el agente reductor se elimina antes del calentamiento. Cuanto más fuerte sea el agente reductor, más probable es que sea adecuado para su uso en un paso previo al tratamiento y eliminado antes de la etapa a). Por consiguiente, en una modalidad en la que el agente reductor se selecciona entre ácido fosforoso, DDT, TCEP y THP, el agente reductor se elimina antes del paso a). Si se requiere, el agente reductor se puede eliminar antes del calentamiento mediante técnicas de rutina que incluyen diafiltración y similares. El uso de TCEP puede requerir una etapa de oxidación para reintroducir

los enlaces de disulfuro deseados en las moléculas de anticuerpos finales.

En una modalidad, el agente reductor no se elimina antes de que la temperatura alcance el intervalo de 30 a 60 °C. La modalidad en la que el agente reductor permanece en la composición durante el calentamiento en la etapa a) es particularmente beneficioso para los agentes reductores que contienen un único grupo tiol, tales como los agentes reductores seleccionados de glutatión, mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

Si el agente reductor es DTT o ácido fosforoso que son de resistencia intermedia y se retienen para la etapa a) de conversión térmica, entonces pueden emplearse temperaturas en el extremo inferior del intervalo, por ejemplo, en el intervalo de 30 a 45 °C. Además, el uso de estos reactivos en combinación con la temperatura en algunas moléculas puede requerir una etapa de oxidación para reformar algunos o todos los enlaces de disulfuro deseados en las moléculas de monómero del anticuerpo.

En una modalidad, el agente reductor se agrega después de que la composición de anticuerpo está en el intervalo de temperatura de la presente descripción. En una modalidad, el agente reductor se agrega a medida que la composición del anticuerpo ingresa al intervalo de

temperatura de la presente descripción. En una modalidad, el agente reductor se agrega después de que la composición del anticuerpo está en el intervalo de temperatura de la presente descripción. En una modalidad, el agente reductor se agrega en más de una ocasión, por ejemplo antes de que la temperatura esté en el intervalo deseado y/o después de que la composición esté en el intervalo de temperatura establecido. En una modalidad, el agente reductor se agrega dos o más veces durante el proceso.

En las modalidades anteriores, en donde el agente reductor se agrega antes del calentamiento en la etapa a) y permanece en la composición durante el calentamiento en la etapa a) o se agrega a medida que la composición del anticuerpo ingresa al intervalo de temperatura o después de que la composición del anticuerpo esté en el intervalo de temperatura de la presente descripción, el agente reductor puede eliminarse durante o después de la etapa de calentamiento mediante técnicas de rutina que incluyen diafiltración y similares.

En una modalidad, el método comprende una etapa adicional de someter la composición a condiciones de oxidación después del paso a) para reformar uno o más enlaces de disulfuro en el anticuerpo. Esta modalidad puede ser beneficiosa si se usa un agente reductor tal como ácido fosforoso, DDT, TCEP o THP. Alternativamente, el método no

comprende una etapa de someter la composición a condiciones de oxidación después del paso a). No se requiere una etapa de oxidación particularmente cuando se usa un agente reductor que comprende un solo grupo tiol tal como glutatión, 5 mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

Un beneficio adicional del método de acuerdo con la presente descripción es que la molécula del anticuerpo no es 10 desplegada por las condiciones empleadas. Es decir, se minimiza la desactivación resultante del despliegue de los polipéptidos/proteínas plegados apropiadamente y se evita la necesidad de volver a plegar el anticuerpo. En una modalidad, en donde el anticuerpo comprende múltiples enlaces de 15 disulfuro, no todos los enlaces disulfuro en el anticuerpo son reducidos. Por consiguiente, en las moléculas tales como los así llamados enlaces de disulfuro de intra-cadena de Fab-dsFv en el fragmento de Fab y la Fv del anticuerpo no son reducidos por el método de la presente invención, la β -mea es 20 particularmente ventajosa para las moléculas de Fab-dsFv.

Las concentraciones de los agentes reductores están generalmente en el intervalo de 1mM a 100mM, por ejemplo 10 a 90mM, tal como 30 a 90mM, 60 a 90 mM, 70 a 90 mM, 70 a 80 mM, 80 a 90 mM, 30 a 50 mM o 20 a 50 mM. En una modalidad, la 25 concentración del agente reductor se selecciona entre 15 mM,

20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 83 mM, 85 mM, 90 mM y 100 mM.

En una modalidad, el agente reductor se emplea en presencia de un aminoácido, por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico, un aminoácido polar o un aminoácido cargado. Sin desear que esté limitado por la teoría, se cree que la presencia del aminoácido actúa para estabilizar la estructura de la molécula, de la molécula del anticuerpo recombinante durante la etapa de conversión térmica y, por lo tanto, protege contra la desnaturalización térmica, mejorando así el rendimiento general. En una modalidad, el aminoácido se selecciona entre arginina, lisina, alanina, prolina, serina y glicina. En una modalidad, la concentración del aminoácido está en el intervalo de 0.01 a 1.0 M, por ejemplo, de 0.01 a 0.8 M, de 0.2 a 0.8 M o de 0.7 a 0.8 M. En una modalidad, la concentración de aminoácido se selecciona entre 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 o 0.9 M.

En una modalidad, el aminoácido es la prolina, alanina o lisina. En una modalidad, la concentración de la prolina, alanina o lisina empleada está en el intervalo de 10 a 800 mM, por ejemplo, 20, 55, 110, 280, 555 o 777 mM.

El aminoácido puede añadirse a la composición de anticuerpo recombinante antes o después de que la temperatura esté en el intervalo relevante, por ejemplo, de 30 a 60 °C, en particular un intervalo o temperatura específica descrita

en este documento. En una modalidad, el aminoácido se agrega a la composición antes de que la temperatura se eleve al intervalo de 30 a 60 °C.

En una modalidad, se añade una sal básica, por ejemplo, una sal de citrato, una sal de sulfato o una sal de carbonato, tal como una sal de citrato o sal de sulfato.

En una modalidad, el período de mantenimiento de la temperatura en el intervalo deseado es de aproximadamente 1 a 70 horas, por ejemplo de 2 a 60 horas, tal como de 3 a 50 horas, de 3 a 10 horas, de 4 a 6 horas, en particular de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 horas.

En una modalidad, la etapa térmica se realiza en la presencia de agitación concomitante, por ejemplo cuando la agitación está en el intervalo de 100 a 1200 rpm, tal como 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o 1200 rpm.

En una modalidad, la concentración del anticuerpo en la composición está en el intervalo de 1.5 g/l a 5 g/l, por ejemplo, 2 g/l a 4 g/l, tal como 2 g/l a 3 g/l.

En una modalidad, el método no emplea un aminoácido y emplea una concentración de la molécula del anticuerpo en el intervalo de 1.5 g/l a 5 g/l, se realiza a una temperatura de aproximadamente 50 °C en la presencia de 50 a 90 mM de un agente reductor tal como BMEA o BME, en particular BMEA,

durante un período de aproximadamente 5 horas. Ventajosamente, el rendimiento puede ser tan alto como el 90%, en el que el 60% o más del mismo es del monómero.

En una modalidad del método de la presente
5 invención, se emplean las siguientes condiciones de reacción: el agente reductor es la BMEA, el aminoácido es la lisina, la temperatura es de 50 °C y el período es de aproximadamente 5 horas.

En una modalidad, la etapa de conversión térmica se
10 realiza a una temperatura en el intervalo de 45 a 55 °C, tal como 50 °C, en la presencia de 50 a 90 mM, tal como 50 mM o 75 mM, de un agente reductor tal como BMEA o BME, en particular BMEA durante un período de 4 a 6 horas, tal como 5 horas.

En esta modalidad, la concentración del anticuerpo
15 está preferiblemente en el intervalo de 2 a 3 g/l. En una modalidad, la etapa a) se realiza a una temperatura de 50 °C, durante un período de 5 horas y en la etapa b) el agente reductor es BMEA o BME y está en una concentración de 70 a 80
20 mM, por ejemplo, 75 mM. En esta modalidad, la etapa de conversión térmica se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un aminoácido seleccionado de prolina, alanina o lisina a una concentración en el intervalo de 0.01 a 0.8 M, como 0.7 a 0.8 M.

25 En una modalidad adicional del método de la

presente descripción, se emplean las siguientes condiciones de reacción en la etapa de conversión térmica: el agente reductor es BMEA a una concentración de 75 mM, el aminoácido es la lisina a una concentración de 0.7 a 0.8M, el la
 5 temperatura es de 50 ° C y el período es de aproximadamente 5 horas y la concentración del anticuerpo es de 2 a 3 g/l, tal como 2.75 g/l. Ventajosamente, el rendimiento puede ser de hasta 82%, con 79% o más del mismo, que es del monómero.

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos
 10 intactos (enteros), es decir que comprenden los elementos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que son moléculas que comprenden anticuerpos enteros o un fragmento de unión del mismo. El fragmento de unión como se emplea aquí se refiere a una molécula semejante a un anticuerpo que
 15 comprende uno, dos, tres o más sitios de unión, en donde la molécula no contiene una cadena pesada ni una cadena ligera de longitud completa de un "anticuerpo entero". En una modalidad, el fragmento de unión no comprende un(unos) dominio(s) C_H2 y/o C_H3 . Los fragmentos de unión de los
 20 anticuerpos incluyen anticuerpos de una sola cadena (es decir una cadena pesada y una cadena ligera de longitud completa); Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-
 25 scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de

unión al epítopo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech*, 23(9):1126-1136, Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217), por ejemplo los formatos de FabFv descritos en WO2009/040562 y las versiones estabilizadas con disulfuro del mismo como se describe en WO2010/035012. El término "fragmento de Fab" cuando se utilice aquí se refiere a un fragmento del anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL (ligero variable) y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH (pesado variable) y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

Los métodos para crear y fabricar fragmentos del anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos del anticuerpo para su uso en la presente descripción incluyen los fragmentos de Fab y Fab' descritos en WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La molécula de Fab' típica comprende un par de cadena pesada y ligera en el cual la cadena pesada comprende una región variable V_H , un dominio constante C_{H1} y una región de articulación y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L . En una modalidad se proporciona un dímero de un Fab', por ejemplo la dimerización

puede ser a través de la articulación.

En una modalidad, la molécula del anticuerpo expresada de manera recombinante es una molécula del anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo 5 biespecífico o trispecífico. La "molécula bi-específica" como se emplea aquí se refiere a una molécula con dos sitios de unión al antígeno, que se puede unir a los mismos o a diferentes antígenos. La "molécula tri-específica" como se emplea aquí se refiere a una molécula con tres sitios de 10 unión al antígeno, que se puede unir a los mismos o a diferentes antígenos. El "anticuerpo multi-específico" como se emplea aquí se refiere a una molécula del anticuerpo como se describe aquí que tiene dos o más dominios de unión, por ejemplo dos o tres dominios de unión. En una modalidad, los 15 dominios se unen todos al mismo antígeno, incluyendo la unión al mismo epítipo sobre el antígeno o la unión a epítopos diferentes sobre el antígeno.

El "sitio de unión al antígeno" como se emplea aquí se refiere a una parte de la molécula, que comprende un par 20 de regiones variables, en particular un par afín, que interactúa específicamente con el antígeno objetivo. El sitio de unión, el sitio de unión al antígeno, el dominio de unión, el dominio de unión al antígeno se emplean intercambiabilmente aquí a menos que el contexto lo indique 25 de otra manera.

Por consiguiente, en una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende un dominio de unión. Un dominio de unión que generalmente comprenderá 6 CDR, tres de una cadena pesada y tres de una cadena ligera. En una modalidad, 3 CDR de cada

5 cadena están en un soporte y junto con este soporte los mismos forman una región variable. Por consiguiente, en una modalidad, una molécula del anticuerpo comprende un dominio de unión específico para el antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena

10 pesada. El fragmento activo como se emplea aquí es sinónimo de un fragmento de unión.

"Específicamente" como se emplea aquí está propuesto para referirse a un sitio de unión al antígeno que solamente reconoce el antígeno para el cual el mismo es

15 específico o un sitio de unión que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno para el cual el mismo es específico comparado con la afinidad hacia los antígenos para los cuales el mismo no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces de afinidad de unión más

20 elevada. La afinidad de unión se puede medir por medio de un ensayo estándar, por ejemplo la resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore.

Los residuos en los dominios variables del anticuerpo se numeran convencionalmente de acuerdo con un

25 sistema contemplado por Kabat et al. Este sistema se describe

en Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, E.U.A. (de aquí en adelante "Kabat et al. (*supra*)"). Este sistema de numeración se utiliza en la
5 presente especificación excepto en donde se indique de otra manera.

Las designaciones de residuo de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de los aminoácidos. La secuencia de aminoácidos
10 lineal, real, puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que en la numeración de Kabat estricta que corresponde a un acortamiento de, o una inserción en, un componente estructural, si se trata del soporte o de la región de determinación de la complementariedad (CDR), de la
15 estructura del dominio variable básico. La numeración de Kabat correcta de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por medio de la alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

20 Las CDR del dominio variable de cadena pesada se localizan en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M.J. Mol. Biol, 196, 901-917
25 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el

residuo 26 hasta el residuo 32. Por consiguiente, a menos que se indique de otra manera, "CDR-H1" como se emplea aquí se refiere a los residuos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la
5 definición del bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

10 En el método de la presente invención el anticuerpo comprende al menos un Fv (par VH/VL) con especificidad hacia un antígeno de interés en donde el VH y el VL están conectados directa o indirectamente por medio de uno o más enlazadores y son estabilizados por medio de un enlace de
15 disulfuro entre los mismos.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un enlace de disulfuro adicional, por ejemplo en donde el disulfuro es un enlace de disulfuro inter-cadenas, tal como entre la cadena pesada y la cadena
20 ligera y/o en donde la región de articulación está entre dos cadenas pesadas.

En una modalidad, la molécula del anticuerpo expresada de manera recombinante comprende uno o más, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces de
25 disulfuro. En una modalidad, los disulfuros están presentes

de manera natural. En una modalidad uno o más disulfuros están modificados genéticamente para estar en un sitio particular. En una modalidad existe al menos un enlace de disulfuro que está presente de manera natural y al menos un
 5 enlace de disulfuro modificado genéticamente. Un enlace de disulfuro modificado genéticamente como se emplea aquí se refiere a en donde uno o ambos sulfuros en los enlaces de disulfuro fue/fueron introducidos por medio de técnicas de ingeniería genética recombinante.

10 La posición del enlace de disulfuro entre el VH y el VL no está limitada. Los ejemplos de los sitios para los enlaces de disulfuro en los dominios variables incluyen, pero no están limitados a, una posición seleccionada del grupo que comprende:

- 15 • $V_H37 + V_L95C$ véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);
- $V_H44 + V_L100$ véase por ejemplo; Biochemistry 33 5451-5459 Reiter *et al* (1994); o Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 pp. 18327-18331 Reiter *et al*
 20 (1994); o Protein Engineering, vol. 10 no. 12 pp. 1453-1459 Rajagopal *et al* (1997);
- $V_H44 + V_L105$ véase por ejemplo J Biochem. 118, 825-831 Luo *et al* (1995);
- $V_H45 + V_L87$ véase por ejemplo Protein Science 6,
 25 781-788 Zhu *et al* (1997);

- V_H55 + V_L101 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995);

- V_H100 + V_L50 véase por ejemplo Biochemistry 29 1362-136 Glockshuber *et al* (1990);

5 • V_H100b + V_L49;

- V_H98 + V_L46 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);

- V_H101 + V_L46;

10 • V_H105 + V_L43 véase por ejemplo; Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. Vol. 90 pp. 7538-7542 Brinkmann *et al* (1993); o Proteins 19, 35-47 Jung *et al* (1994),

- V_H106 + V_L57 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)

15 y una posición o posiciones correspondientes al mismo en el par de regiones variables localizadas en la molécula.

De acuerdo con esto, en una modalidad, un par de dominios variables (V_H/V_L) de la presente invención puede estar enlazado por medio de un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en V_H y uno en V_L, en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona entre el grupo que consiste de V_H37 y V_L95, V_H44 y V_L100, V_H44 y V_L105, V_H45 y V_L87, V_H100 y V_L50, V_H100b y V_L49, V_H98 y V_L46, V_H101 y V_L46, V_H105 y V_L43 y V_H106 y V_L57. En una modalidad, el enlace de disulfuro se forma entre las posiciones V_H44 y V_L100.

25

Los pares de aminoácidos enumerados anteriormente están en las posiciones que conducen al reemplazo por cisteínas de tal modo que se puedan formar enlaces de disulfuro. Las cisteínas se pueden modificar genéticamente en estas posiciones deseadas por medio de las técnicas conocidas. En una modalidad, por lo tanto, una cisteína modificada genéticamente de acuerdo con la presente descripción se refiere a en donde el residuo que está presente de manera natural en una posición del aminoácido dado ha sido reemplazado con un residuo de cisteína.

La introducción de las cisteínas modificadas genéticamente se puede llevar a cabo utilizando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, mutagénesis de superposición de extensión de PCR, mutagénesis dirigida a un sitio o mutagénesis de casete (véase, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida a un sitio están comercialmente disponibles, por ejemplo el kit de mutagénesis dirigida a un sitio de QuikChange® (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis en casete se puede llevar a cabo en base a Wells

et al., 1985, *Gene*, 34:315-323. De manera alternativa, los mutantes se pueden fabricar por medio de la síntesis génica total por recocido, ligadura y amplificación de PCR y clonación de oligonucleótidos de superposición.

5 De manera general, el par VH/VL, en donde el VH y el VL que están conectados directa o indirectamente por medio de uno o más enlazadores y son estabilizados por medio de un enlace de disulfuro entre los mismos, son un par VH/VL complementario que forma un sitio de unión al antígeno y se
10 une al antígeno de manera cooperativa, es decir un par VH/VL complementario que tiene afinidad hacia el mismo antígeno y se une al antígeno de manera co-operativa. De manera típica, los mismos serán un par VH/VL derivado del mismo anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo generado *in vivo* por medio de un
15 elemento hospedero. La unión del antígeno de manera co-operativa como se emplea aquí se refiere a las regiones variables unidas conjuntamente al antígeno objetivo específicamente.

 En una modalidad, el anticuerpo comprende al menos
20 un Fv en donde el VH no está fusionado en el C-terminal con un dominio constante de cadena pesada CH1 y el VL no está fusionado en el C-terminal con una región constante de cadena ligera CL (C kappa o C lambda).

 Los dominios VH y VL son capaces de formar
25 interacciones, lo cual conduce a la formación de multímeros

por las interacciones con los dominios VH o VL en otras moléculas del anticuerpo.

En el Fv, los dominios VH y VL pueden estar conectados directamente entre sí por medio de un enlazador
5 o indirectamente por medio de enlazadores a una o más moléculas adicionales. La conexión entre VH y VL "fija" o define la relación entre un par VH y VL dado de tal modo que si el VH forma un par con un VL en otra molécula se forma un multímero a causa de que la relación entre el VH
10 y VL originales es mantenida por la presencia de la conexión.

Por el contrario, en un Fv en donde los dominios VH y VL no están conectados por medio de uno o más enlazadores, los dominios VH y VL son capaces de "desprenderse" (también
15 referido como una pausa) y cuando los mismos se reparan si uno de los dominios variables no es del par original (pero tiene la misma secuencia que la región variable original que el mismo reemplaza) entonces la molécula solamente será reformada como un monómero.

20 El enlazador referido en la presente invención preferentemente no es un enlace de disulfuro. Los enlazadores adecuados para su uso en los anticuerpos son bien conocidos en la técnica. El enlazador puede comprender uno o más aminoácidos. En una modalidad adicional, el enlazador es un enlazador del
25 péptido que comprende de 2 a 40 aminoácidos, tal como 2 a 30, 2

a 20 o 2 a 10 aminoácidos. Los ejemplos de los enlazadores del péptido incluyen aquellos descritos posteriormente.

En una modalidad, el enlazador se selecciona de una secuencia mostrada en la secuencia 39 a 90.

5 Secuencias del enlazador de la articulación

SEC ID NO:	SECUENCIA
39	DKTHTCAA
40	DKTHTCPPCPA
41	DKTHTCPPCPATCPPCPA
42	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
43	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
44	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
45	DKTHTCCVECPCPA
46	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
47	DKTHTCPSCPA

Secuencias del enlazador flexible

SEC ID NO:	SECUENCIA
48	SGGGGSE
49	DKTHTS
50	(S)GGGGS
51	(S)GGGGSGGGGS
52	(S)GGGGSGGGSGGGGS
53	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGGS

SEC ID NO:	SECUENCIA
54	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
55	AAAGSG-GASAS
56	AAAGSG-XGGGS -GASAS
57	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
58	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
59	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
60	AAAGSG-XS-GASAS
61	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
62	ATTTGSSPGPT
63	ATTTGS
-	GS
64	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
65	GTVAAPSVFIFPPSD
66	GGGGIAPSMVGGGGS
67	GGGGKVEGAGGGGGS
68	GGGGSMKSHDGGGGS
69	GGGGNLITIVGGGGS
70	GGGGVVPSLPGGGGS
71	GGEKSIPGGGGS
72	RPLSYRPPFPFGPSVRP
73	YPRSIYIRRRHPSPLTT
74	TPSHLSHILPSFGLPTFN
75	RPVSPFTFPRLSNSWLPA

SEC ID NO:	SECUENCIA
76	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
77	APGPSAPSHRSLPSRAFG
78	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
79	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
80	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
81	NPSLNPPSYLHRAPSRI
82	LPWRTSLLPSLPLRRRP
83	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
84	VPPAPVVSLRSAHARPPY
85	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
86	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
87	CNPLLPLCARSPAVRTFP
88	GGGGSGGGGTGGGGS

(S) es opcional en las secuencias 50 a 54.

Los ejemplos de los enlazadores rígidos incluyen las secuencias del péptido GAPAPAAPAPA (SEC ID NO: 89), PPPP (SEC ID NO: 90) y PPP.

En un aspecto de la presente invención, el Fv comprende un dominio VH y un dominio VL que están conectados directamente por medio de un solo enlazador. Los enlazadores adecuados para conectar directamente el dominio VH y el dominio VL se describieron anteriormente.

En una modalidad, el VH y el VL forman un fragmento variable de una sola cadena estabilizado con disulfuro,

también referido como dsscFv, la molécula del cual es un fragmento variable de una sola cadena con un enlazador del péptido entre el dominio variable VH y VL y un enlace de disulfuro inter-dominios entre el V_H y el V_L.

5 En esta modalidad, la molécula de dsscFv puede estar fusionada con una o más moléculas adicionales, preferentemente a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión del mismo para formar anticuerpos bi, tri o tetraivalentes. El dsscFv está fusionado con una o más
10 moléculas adicionales por medio de uno o más enlazadores que pueden estar colocados en el dominio VH, el dominio VL o tanto el VH como el VL. Por ejemplo, una o más moléculas de dsscFv pueden estar fusionadas con el C-terminal o el N-terminal de una o más cadenas de un anticuerpo entero o
15 fragmento de unión del mismo. Por ejemplo, dos o más moléculas de dsscFv pueden estar fusionadas conjuntamente para formar un diacuerpo, un scFv en serie (bis-dsscFv) o un minicuerpo.

Los formatos de anticuerpos que pueden tener una
20 propensión a multimerizarse a través de una región Fv incluyen el scFv, diacuerpo, scFv en serie, scFv-Fc en serie, scFv-Fc, scFv-Fc-scFv Fab-scFv, scDiacuerpo, scDiacuerpo-Fc, scDiacuerpoCH₃, IgG-scFv, scFv-IgG, IgG dos en uno, IgG del dominio V doble, IgG-V y V-Ig. Cuando se emplea un enlace de
25 disulfuro en el Fv o en el scFv para estabilizar estas

construcciones, entonces puede ser benéfico emplear el presente método para mejorar el rendimiento del monómero obtenido.

En un aspecto adicional de la presente invención,
5 cada VH y VL comprende un enlazador que conecta indirectamente el VH y el VL por medio de una segunda molécula. En este aspecto, el dominio VH y el dominio VL están enlazados a la segunda molécula por medio de enlazadores separados. Los enlazadores adecuados para unir
10 cada dominio variable con la segunda molécula se describieron anteriormente. La segunda molécula proporciona la conexión indirecta entre el VH y el VL. Cada VL y VH está enlazado a la segunda molécula en una posición adecuada para permitir que los dominios VH y VL se unan cooperativamente al antígeno
15 objetivo. El dominio VH y el dominio VL no están conectados directamente entre sí por medio de un enlace del péptido o un enlazador del péptido.

En este aspecto, la segunda molécula preferentemente es un segundo anticuerpo o un fragmento de
20 unión del mismo para formar anticuerpos bi, tri o tetravalentes. En una modalidad, los dominios VH y VL están enlazados indirectamente por medio de un anticuerpo entero o un Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado o F(ab')₂. Por ejemplo, cuando el segundo anticuerpo es un Fab, el dominio
25 VH se puede fusionar con el C-terminal de la región constante

de cadena pesada tal como el CH1 del segundo anticuerpo y el anticuerpo de un solo dominio VL se puede fusionar con el C-terminal de la región constante de cadena ligera (C kappa o C lambda) del segundo anticuerpo, formando por esto un Fab-
5 dsFv. Los anticuerpos de Fab-dsFv se describen con detalle en WO2010/035012 y WO2011/036460, ambos incorporados aquí para referencia.

El anticuerpo puede comprender dominios de unión adicionales, por ejemplo como para la molécula de DVD-Ig
10 estabilizada con disulfuro como se describe en WO2011/117653, o el así llamado (FabFv)2Fc descrito en WO2011/030107, cada uno incorporado aquí para referencia. Por consiguiente, el anticuerpo como se emplea aquí incluye anticuerpos bi, tri o tetravalentes.

15 Otros formatos de anticuerpos adecuados que se pueden emplear en el método de la presente invención se describen en WO2011/030107 que describe los anticuerpos de FabFvFc y de (FabFv)2Fc, WO2011/061492 que describe los anticuerpos de Fab-dsFv conjugados a PEG y WO2011/086091 que
20 describe el Fab-dsFv-dsFv, cada uno incorporado aquí para referencia, en donde se emplea un enlace de disulfuro en el Fv o en el scFv.

Otros formatos de anticuerpos adecuados que se pueden emplear en el método de la presente invención para
25 mejorar el rendimiento del monómero se describen en

WO2015/197772, incorporado aquí para referencia, que describe una molécula del anticuerpo multi-específico que comprende o consiste de:

a) una cadena del polipéptido de la fórmula (I):

5 $V_H-CH_1-X-V_1$; y

b) una cadena del polipéptido de la fórmula (II):

$V_L-C_L-Y-V_2$;

en donde:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

10 CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un enlazador;

Y representa un enlace o un enlazador;

15 V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv

20 en donde al menos uno de V_1 y V_2 es un dsscFv.

El "fragmento variable de una sola cadena" o "scFv" como se emplea aquí se refiere a un fragmento variable de una sola cadena que comprende o consiste de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se estabiliza por medio de un enlazador del péptido

25

entre los dominios variables V_H y V_L . Los dominios variables V_H y V_L pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo el C-terminal de V_H puede estar enlazado al N-terminal de V_L o el C-terminal de V_L puede estar enlazado al
 5 N-terminal de V_H .

El "fragmento variable de una sola cadena estabilizado con disulfuro" o "dsscFv" como se emplea aquí se refiere a un fragmento variable de una sola cadena que se estabiliza por medio de un enlazador del péptido entre el
 10 dominio variable V_H y V_L y también incluye un enlace de disulfuro inter-dominios entre V_H y V_L .

El "fragmento variable estabilizado con disulfuro" o "dsFv" como se emplea aquí se refiere a un fragmento variable de una sola cadena que no incluye un enlazador del
 15 péptido entre los dominios variables V_H y V_L y se estabiliza en lugar de esto por medio de un enlace de disulfuro inter-dominios entre V_H y V_L .

El "anticuerpo de un solo dominio" o "sdAb" como se emplea aquí se refiere a un fragmento del anticuerpo que
 20 consiste de un solo dominio del anticuerpo variable monomérico, tal como V_H o V_L o V_{HH} .

Los ejemplos de los formatos de anticuerpos se muestran en la figura 28. En una modalidad, tanto V_1 como V_2 son el dsscFv y este formato de anticuerpo también puede ser
 25 referido aquí como un Fab-2xdsscFv. Los dominios variables V_H

y V_L pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo el C-terminal de V_H puede estar enlazado al N-terminal de V_L o el C-terminal de V_L puede estar enlazado al N-terminal de V_H .

5 Otros formatos de anticuerpos adecuados que se pueden emplear en el método de la presente invención para mejorar el rendimiento del monómero se describen en el ejemplo 4 de WO2013/068571, incorporado aquí para referencia, que describe un formato de anticuerpo de Fab-dsscFv. Los
10 ejemplos de los formatos de anticuerpos se muestran en la figura 29.

En una modalidad, el anticuerpo no comprende un dominio C_H2 y/o C_H3 .

En una modalidad, el fragmento del anticuerpo es el
15 así llamado formato de Fab-dsFv, por ejemplo como se describe en WO2010/035012 y WO2011/036460, cada uno incorporado aquí para referencia.

En una modalidad, el anticuerpo es un Fab estabilizado con disulfuro como se describe en WO2011/117648.

20 En una modalidad, el anticuerpo no es un Fab estabilizado con disulfuro como se describe en WO2011/117648.

En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para el OX40.

En una modalidad, el anticuerpo comprende un
25 dominio de unión específico para la albúmina del suero.

En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para el OX40 y un dominio de unión específico para la albúmina del suero, en particular un formato de Fab-dsFv, tal como en donde el dominio de unión a la albúmina del suero es la parte de Fv, en particular la A26Fab-645dsFv del anticuerpo biespecífico, específico para el OX40 y la albúmina del suero humano descritos en WO2013/068563 incorporado aquí para referencia.

La presente descripción proporciona una proteína de fusión del anticuerpo biespecífico que se une al OX40 humano y a la albúmina del suero humano que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (V_{H1}), un dominio C_{H1} y un segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}),

una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (V_{L1}), un dominio C_L y un segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}),

en donde las cadenas pesadas y ligeras están alineadas de tal modo que el V_{H1} y el V_{L1} formen un primer sitio de unión al antígeno y el V_{H2} y el V_{L2} formen un segundo sitio de unión al antígeno,

en donde el antígeno unido por medio del primer sitio de unión al antígeno es el OX40 humano y el antígeno

unido por medio del segundo sitio de unión al antígeno es la albúmina del suero humano, en particular

en donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:1
5 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO:2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEC ID NO:3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEC ID NO:5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la
10 SEC ID NO:6 para CDR-L3,

en donde el segundo dominio variable de cadena pesada (V_H2) tiene la secuencia dada en la SEC ID NO:11 y el segundo dominio variable de cadena ligera (V_L2) tiene la secuencia dada en la SEC ID NO:12 y el segundo dominio
15 variable de cadena pesada (V_H2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_L2) están enlazados por medio de un enlace de disulfuro.

En una modalidad existe un enlazador del péptido entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de cadena
20 pesada (V_H2). En una modalidad existe un enlazador del péptido entre el dominio CL y el segundo dominio variable de cadena ligera (V_L1). En una modalidad, el primer dominio variable de cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:8. En una modalidad, el primer dominio
25 variable de cadena ligera (V_L1) comprende la secuencia dada

en la SEC ID NO:7. En una modalidad, la cadena pesada comprende o consiste de la secuencia dada en la SEC ID NO:15. En una modalidad, la cadena ligera comprende o consiste de la secuencia dada en la SEC ID NO:16.

5 En una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende un dominio de unión a la albúmina del suero, por ejemplo que comprende una, dos o tres CDR de cadena pesada de la región variable mostrada en la SEC ID NO:29 o 30, y una, dos o tres CDR de cadena ligera de la región variable
10 mostrada en la SEC ID NO:31 o 32, en particular tres CDR de cadena pesada de la región variable mostrada en SEC ID NO:29 o 30, tales como CDRH1 para CDRH1, CDRH2 para CDH2, CDRH3 para CDH3 y tres CDR de cadena ligera de la región variable mostrada en la SEC ID NO: 31 o 32, tal como CDRL1 para CDRL1,
15 CDRL2 para CDL2, CDRL3 para CDL3.

 En una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende una región variable pesada mostrada en la SEC ID NO:30. En una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende una región variable ligera mostrada en la SEC ID NO:32. En
20 una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende una región variable pesada mostrada en la SEC ID NO:30 y una región variable ligera mostrada en la SEC ID NO:32.

 En una modalidad, la cadena pesada comprende o consiste de la SEC ID NO:15 o 19. En una modalidad, la cadena
25 ligera comprende o consiste de la SEC ID NO:16 o 20. En una

modalidad, la molécula del anticuerpo del fragmento de unión comprende las SEC ID NO:15 y 16, 15 y 20, 16 y 19 o 19 y 20. Por consiguiente, en una modalidad se proporciona una proteína de fusión del anticuerpo biespecífico que se une al
5 OX40 humano y a la albúmina del suero humano, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:16.

En una modalidad, la molécula del anticuerpo, tal
10 como un formato de Fab-dsFv, es uno descrito en WO2014/019727, incorporado aquí para referencia.

En una modalidad, la molécula del anticuerpo comprende un dominio de unión específico para la albúmina del suero humano, en particular con las CDR o las regiones
15 variables como se describe en WO2013/068571, incorporado aquí para referencia.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de acuerdo con la presente descripción es monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por medio de
20 cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole *et al.*, "Monoclonal
25 Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss,

Inc., 1985).

Las moléculas del anticuerpo empleadas en los métodos de la presente descripción también se pueden generar utilizando los métodos de anticuerpos de un solo linfocito
5 por medio de la clonación y expresión de las ADNc de la región variable de la inmunoglobulina generadas a partir de los linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, por los métodos descritos por Babcook, J et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*
10 *E.U.A.*, 1996, 93(15), 7843-7848, WO92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Las moléculas de los anticuerpos humanizados son moléculas del anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad
15 (CDR) de la especie no humana y una región de soporte de una molécula de inmunoglobulina humana que comprende opcionalmente uno o más residuos del donador de la especie no humana (véase, por ejemplo, US5,585,089). En una modalidad, las moléculas del anticuerpo que son sometidas al método de
20 la presente descripción son humanizadas.

Los anticuerpos empleados en los métodos de la presente invención también se pueden generar utilizando varios métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al., *J.*
25 *Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames et al., *J. Immunol.*

Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. *Eur. J. Immunol*, 1994, 24, 952-958; Persic et al., *Gene*, 1997, 187, 9-18; y Burton et al., *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; 5 WO93/11236; WO95/15982; y WO95/20401; y US5,698,426; US5,223,409; US5,403,484; US5,580,717; US5,427,908; US5,750,753; US5,821,047; US5,571,698; US5,427,908; US5,516,637; US5,780,225; US5,658,727; US5,733,743; y US5,969,108.

10 Los ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, también se pueden utilizar para generar anticuerpos humanizados, por ejemplo utilizando la tecnología de fagos.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos 15 anticuerpos en los cuales las regiones variables y las regiones constantes (en donde están presentes) tanto de cadenas pesadas como de cadenas ligeras son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los 20 ejemplos de los anticuerpos completamente humanos pueden incluir los anticuerpos producidos, por ejemplo por los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente y los anticuerpos producidos por ratones en los cuales los genes de la región variable y/o constante de la 25 inmunoglobulina de murino han sido reemplazados por sus

contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en EP0546073, US5,545,806, US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016, US5,770,429, EP0438474 y EP0463151.

5 El material de anticuerpo para su uso en los métodos de la presente invención se puede preparar por medio del uso de técnicas de ADN recombinante que involucran la manipulación y re-expresión del ADN que codifica la(s) región(es) variable(s) y constante(s) del anticuerpo. Se
10 pueden utilizar técnicas de biología molecular estándar para modificar, agregar o delecionar los aminoácidos o los dominios cuando sea deseable. Cualesquiera alteraciones a las regiones variables o constantes están abarcadas por los términos regiones "variable" y "constante" cuando se utilicen
15 aquí.

 El material de partida del anticuerpo se puede obtener a partir de cualquier especie incluyendo, por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o humano. Las partes del anticuerpo se pueden obtener a partir de más
20 de una especie, por ejemplo el anticuerpo puede ser quimérico. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables son de otra. El material de partida del anticuerpo también puede ser modificado. En otro ejemplo, la región variable del anticuerpo se ha creado
25 utilizando técnicas de ingeniería del ADN recombinante. Tales

versiones modificadas genéticamente incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de las regiones variables del anticuerpo natural por medio de inserciones, supresiones o cambios en o a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales.

5 Los ejemplos particulares de este tipo incluyen aquellos dominios de la región variable modificada genéticamente que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos de soporte de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los
10 métodos para crear y fabricar estos anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Boss et al., US4,816,397; Cabilly et al., US 6,331,415, Shrader et al., WO92/02551, Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci, E.U.A., 86, 3833; Riechmann et
15 al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al, 1988, Science, 242, 423, Queen et al., US 5,585,089, Adair, WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

20 En una modalidad el anticuerpo que comprende un par de dominio variable que forma un dominio de unión es un par afín. El par afín como se emplea aquí está propuesto para referirse a un par natural de dominios variables, es decir, aislado de un solo anticuerpo o célula que expresa un
25 anticuerpo. Los dominios variables pueden haber sido

optimizados y/o humanizados. Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par afín todavía se considerarán un par afín después de la optimización/humanización.

5 Por consiguiente, la presente descripción se extiende a someter moléculas del anticuerpo humanas, humanizadas o quiméricas, a los métodos descritos aquí.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno objetivo. El antígeno puede ser una proteína asociada a las células, por ejemplo una proteína de la superficie celular sobre las células tales como las células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o el mismo puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tales como las proteínas reguladas positivamente durante la enfermedad o la infección, por ejemplo los receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos particulares de las proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como las $\beta 1$ integrinas por ejemplo VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o receptor de CSF1, 25 DPCR1, DPCR1, dudulina2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634,

KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectina
 semejante a 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101,
 BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA),
 globulina de la grasa de la leche humana (HMFG1 y 2),
 5 antígenos de clase I de MHC y de clase II de MHC, KDR y VEGF,
 PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, receptor A de IL-7 y, cuando sea
 apropiado, receptores de los mismos.

Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales
 como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13,
 10 IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos
 virales, por ejemplo, antígenos del virus o citomegalovirus
 sincitial respiratorio, inmunoglobulinas, tales como IgE,
 interferones tales como interferón α , interferón β o
 interferón γ , factor de la necrosis tumoral TNF (conocido
 15 inicialmente como factor α de la necrosis tumoral y referido
 aquí como TNF o TNF α), factor β de la necrosis tumoral,
 factores de estimulación de colonias tales como G-CSF o GM-
 CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales
 como PDGF- α y PDGF- β , WISP-1 y, en donde sea apropiado,
 20 receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos
 de la superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas,
 virus tales como la influenza, EBV, HepA, B y C, agentes
 bioterroristas, radionúclidos y metales pesados, y venenos de
 serpientes y arañas y toxinas.

25 En una modalidad, el método comprende la etapa

adicional de purificar una molécula del anticuerpo hasta un estándar adecuado para la administración a un ser humano y luego la formulación del mismo.

Las moléculas del anticuerpo purificadas empleando
5 los métodos descritos aquí tiene una alta afinidad de unión, en particular nanomolar o picomolar.

La afinidad se puede medir utilizando cualquier método conocido, adecuado en la técnica, incluyendo BIAcore™. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión tiene
10 una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor, por ejemplo aproximadamente 50 pM o mejor, tal como aproximadamente 40 pM o mejor, en particular 30 pM o mejor. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión es completamente humano o humanizado y tiene una afinidad de
15 unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

Un derivado de un dominio que está presente de manera natural como se emplea aquí está propuesto para referirse a en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia que está presente de manera
20 natural han sido reemplazados o suprimidos, por ejemplo para optimizar las propiedades del dominio tal como por medio de la eliminación de las propiedades indeseables, pero en donde la(s) peculiaridad(es) de caracterización del dominio es/son conservada(s).

25 También se entenderá por una persona con

experiencia en la técnica que el anticuerpo puede experimentar una variedad de modificaciones post-traduccionales. El tipo y el grado de estas modificaciones dependen frecuentemente de la línea de la célula hospedera
5 utilizada para expresar la molécula así como las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de la metionina, formación de la dicetopiperazina, isomerización del aspartato y desamidación de la asparagina. Una modificación frecuente es
10 la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como la lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ, *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Estos cambios post-traduccionales pueden influenciar a las propiedades de la
15 molécula y por consiguiente impactar en el procesamiento posterior.

En una modalidad, la composición del anticuerpo empleada en el método de la presente descripción no comprende acetato de sodio, por ejemplo a una concentración de 25 mM.
20 En una modalidad, la composición del anticuerpo empleada en el método de la presente descripción no comprende cloruro de sodio, por ejemplo a una concentración de 25 mM.

Los ejemplos de aminoácidos hidrofóbicos incluyen alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina,
25 glicina, tal como alanina, prolina o glicina. Los ejemplos

de aminoácidos polares incluyen asparagina, histidina, serina, treonina, tirosina, cisteína, metionina y triptófano, tal como serina. Los ejemplos de aminoácidos cargados incluyen arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, tal como arginina o lisina, en particular lisina.

Los ejemplos de sales de citrato incluyen sodio, potasio, calcio y magnesio, tales como sodio o potasio, en particular sodio. Los ejemplos de sales de sulfato incluyen amonio, calcio y magnesio, tales como amonio. Los ejemplos de sales de carbonato (que incluyen sales de bicarbonato) incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio y la correspondiente forma de bicarbonato del mismo.

En una modalidad, la sal está en una concentración de 0.5 a 5 mM, tal como 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 mM. En una modalidad, el sulfato de amonio está a una concentración de 4 mM. En una modalidad, el citrato de sodio está en una concentración de 1.5 mM.

En una modalidad, la etapa de conversión térmica de acuerdo con la presente descripción se lleva a cabo sobre un sobrenadante aclarado. El sobrenadante se puede clarificar a través de cualesquiera medios adecuados, por ejemplo centrifugación, filtración o semejantes. En una modalidad, el sobrenadante se clarifica empleando un filtro de 0.22 micrómetros.

En una modalidad, se lleva a cabo una etapa de

cromatografía con la proteína A sobre el sobrenadante antes de la etapa de conversión térmica. La purificación con la proteína A es particularmente ventajosa en el contexto del tipo de moléculas del anticuerpo descritas aquí (en particular aquellas que no comprenden los dominios C_H2C_H3) a causa de que esta técnica permite que el multímero sea resuelto a partir de los monómeros.

El uso de la cromatografía con la proteína A se puede utilizar para recuperar un anticuerpo que contiene un dominio VH3 humano el cual no comprende una región Fc en la forma monomérica. Se ha observado un efecto de avidez entre la unión de los dominios VH3 humanos y la proteína A. Este hallazgo es sorprendente dado que no se ha descrito para la interacción entre las regiones Fc y la proteína A y permite la recuperación de los anticuerpos que contienen un dominio VH3 humano, monoméricos, a partir de una mezcla que contiene las formas monoméricas y multiméricas del anticuerpo.

De acuerdo con esto, la etapa de purificación con la proteína A puede comprender a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene un dominio VH3 humano en la forma monomérica y multimérica a un material de la cromatografía con la proteína A en donde la proteína A comprende el dominio D y/o E, bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo a la proteína A, y b) recuperar el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano en la forma

monomérica, en donde el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano no contiene una región Fc. De manera alternativa, la etapa de purificación con la proteína A comprende: a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene un dominio VH3 humano en la forma monomérica y multimérica a un material de la cromatografía con la proteína A en donde la proteína A comprende el dominio D y/o E, b) permitir la unión del anticuerpo a la proteína A, c) aplicar un amortiguador de elución que interrumpe selectivamente la unión del anticuerpo en la forma monomérica, d) recuperar la sustancia diluida resultante y opcionalmente e) aplicar un segundo amortiguador de elución que interrumpe la unión del anticuerpo en la forma multimérica y recuperar esta segunda sustancia diluida, en donde el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano no contiene una región Fc. En una modalidad, en donde el anticuerpo es la A26Fab-645dsFv del anticuerpo específico para el OX40 y para la albúmina del suero humano descritos en W02013/068563, la purificación con la proteína A se lleva a cabo como anteriormente en donde en la etapa c) el amortiguador de elución tiene un pH de pH 3.5 a pH 4.2, preferentemente pH 3.6 a pH 4.1, pH 3.7 a pH 4.0, preferentemente pH 3.8 a pH 3.9 o pH 3 para interrumpir la unión del monómero y en la etapa opcional e) el amortiguador de elución tiene un pH inferior a 3.5, preferentemente inferior a pH 3.4, preferentemente pH 2.8 a pH 3.2,

preferentemente pH 2.9 a pH 3.1, preferentemente pH 3.0 que interrumpe la unión del anticuerpo en la forma multimérica.

De manera alternativa, la etapa de purificación con la proteína A comprende: a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene un dominio VH3 humano en la forma monomérica y multimérica a un material de la cromatografía con la proteína A en donde la proteína A comprende el dominio D y/o E, b) permitir la unión del anticuerpo en la forma multimérica, c) recuperar el anticuerpo en la forma monomérica a través del flujo, y opcionalmente d) aplicar un amortiguador de elución que interrumpe selectivamente la unión del anticuerpo en la forma multimérica, y e) recuperar la sustancia diluida resultante de d); en donde el anticuerpo que contiene un dominio VH3 humano no contiene una región Fc.

En una modalidad alternativa, no se lleva a cabo ninguna cromatografía con la proteína A antes de la etapa de conversión.

En una modalidad, el método comprende una etapa de procesamiento posterior adicional. En una modalidad, el método comprende la etapa adicional de purificación posterior, por ejemplo, en donde el procesamiento posterior comprende una etapa de cromatografía, tal como la cromatografía de interacción hidrofóbica o la cromatografía de intercambio iónico.

Una etapa de procesamiento posterior como se emplea

aquí se refiere al menos a una etapa empleada subsiguiente a la etapa a) para purificar adicionalmente la molécula del anticuerpo. Los ejemplos de los procesamiento posteriores incluyen una o más etapas de cromatografía, por ejemplo la cromatografía por exclusión de tamaño, la cromatografía de intercambio iónico (tal como la cromatografía de intercambio aniónico o la cromatografía de intercambio catiónico), la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, tal como la cromatografía con la proteína A (tal como una columna de MabSelect). Las técnicas empleadas en el procesamiento posterior de los polipéptidos y las proteínas son bien conocidas por aquellas personas con experiencia en la técnica.

En una modalidad, el procesamiento posterior comprende una etapa de cromatografía, en particular la cromatografía de intercambio iónico. En una modalidad, el método comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico seguida por una etapa de cromatografía de intercambio catiónico o *viceversa*. En una modalidad se emplea la cromatografía de interacción hidrofóbica. En una modalidad, se emplea la cromatografía de modo mixto. En una modalidad se emplean las etapas de cromatografía múltiple.

En una modalidad, el método comprende una etapa de inactivación del virus, por ejemplo mantener la composición que contiene la proteína a un pH definido, por ejemplo un pH

bajo durante un período de tiempo definido.

En una modalidad, la etapa de procesamiento posterior final es la etapa de diafiltración y de intercambio de amortiguador para proporcionar el amortiguador de
5 almacenamiento final y la concentración para la proteína.

En una modalidad, el procesamiento posterior comprende la purificación con la proteína A (tal como una columna MabSelect), como se describió anteriormente antes de la etapa de conversión.

10 En una modalidad, el procesamiento posterior comprende además una etapa de inactivación viral, seguida por ultrafiltración e intercambio de amortiguador, a su vez seguida por la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico subsiguiente y una
15 etapa de filtración de los virus.

En una modalidad, el procesamiento posterior después de la etapa de conversión comprende una etapa de inactivación viral, seguida de ultrafiltración e intercambio de amortiguador, a su vez seguida por la cromatografía de
20 intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico subsiguiente y una etapa de filtración viral.

En una modalidad, el procesamiento posterior comprende además una etapa de inactivación viral, seguida por ultrafiltración e intercambio de amortiguador, a su vez
25 seguida por la cromatografía de intercambio catiónico y la

cromatografía de intercambio aniónico subsiguiente y una etapa de filtración viral.

Otras etapas del procesamiento posterior incluyen la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) o
5 cromatografía de modo mixto.

En una modalidad, la etapa de procesamiento posterior final es la etapa de diafiltración y de intercambio de amortiguador para proporcionar el amortiguador de almacenamiento final y la concentración para la proteína.

10 En una modalidad, el método descrito aquí proporciona la etapa adicional de conjugar una molécula del anticuerpo monomérico purificado con una o más moléculas efectoras. La molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de tales moléculas enlazadas
15 para formar una sola porción que se puede fijar a la molécula del anticuerpo.

Cuando se desea obtener un anticuerpo enlazado a una molécula efectora, esta se puede preparar por medio de procedimientos de ADN recombinante o químicos estándar en los
20 cuales el anticuerpo está enlazado, ya sea directamente o por medio de un agente de unión a la molécula efectora. Las técnicas para la conjugación de tales moléculas efectoras con un anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véase Hellstrom *et al.*, *Controlled Drug Delivery*, 2/a. Ed.,
25 Robinson *et al.*, eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982,

Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, 5 WO89/01476 y WO03031581. De manera alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlazamiento se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en WO86/01533 y EP0392745.

10 El término molécula efectora cuando se utilice aquí, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros que están presentes de manera natural 15 o sintéticos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden 20 detectarse por medio de la espectroscopia de RMN o ESR.

Los ejemplos de las moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial (por ejemplo que extermine) para las células. Los ejemplos incluyen 25 combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina,

maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no están limitadas a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSN) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorubicina (inicialmente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (inicialmente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto ^{213} ,

Californio²⁵², Iridio¹⁹² y Tungsteno¹⁸⁸/Renio¹⁸⁸; o fármacos tales como, pero sin estar limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas,
5 péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no están limitadas a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no están limitados a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A,
10 pseudomonas de exotoxina, o toxina de la difteria, una proteína tal como la insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno del tejido, un agente trombótico o un agente
15 anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor de estimulación de colonias del macrófago de granulocitos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-
20 CSF), factor de crecimiento de los nervios (GF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de las sustancias detectables incluyen varias
25 enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes,

materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales que emiten positrones (para su uso en la tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase generalmente
5 US4,741,900 para los iones metálicos los cuales se pueden conjugar con los anticuerpos para su uso como un recurso de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados
10 incluyen la estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen
15 luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la
20 inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de las moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la
25 albúmina tales como los descritos en WO05/117984.

En donde la molécula efectora es un polímero la misma puede ser, en general, un polímero sintético o un polímero que está presente de manera natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un
5 polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados
10 anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxil, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen el poli(etilenglicol) poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal
15 o ramificada opcionalmente sustituido, o derivados de los mismos, especialmente el poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como el metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo. Los polímeros que están presentes de manera natural específicos de origen incluyen lactosa, amilosa,
20 dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

Los "derivados" cuando se utilicen aquí, están propuestos para incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como las maleimidas y semejantes. El grupo reactivo puede estar enlazado
25 directamente o por medio de un segmento enlazador al

polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo formará en algunos casos parte del producto como un grupo enlazador entre el anticuerpo de la descripción y el polímero.

El tamaño del polímero se puede hacer variar cuando
5 se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio desde 500 Da hasta 50000 Da, por ejemplo desde 5000 hasta 40000 Da, tal como desde 20000 hasta 40000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar en particular sobre la base del uso propuesto del producto, por ejemplo la
10 capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores o la vida media en la circulación prolongada (para revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por consiguiente, por ejemplo, en donde el producto está propuesto para dejar la circulación y penetrar el
15 tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular aproximadamente de 5000 Da. Para las aplicaciones en donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso
20 utilizar un polímero de peso molecular más elevado, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo desde 20000 Da hasta 40000 Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o,
25 especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del

mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 15000 Da hasta aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, un anticuerpo para su uso en la presente invención está fijado a las porciones del poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, las moléculas de PEG pueden estar fijadas a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o de cadena lateral de aminoácido disponible localizado en el anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre de amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden estar presentes de manera natural en el anticuerpo o pueden ser modificados genéticamente en el anticuerpo utilizando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, US5,219,996; US5,667,425; WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de la presente invención es un anticuerpo modificado en donde la modificación es la adición al C-terminal-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la fijación de una molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples sitios para fijar dos o más moléculas de PEG. En una modalidad, una molécula de PEG está enlazada a una cisteína 171 en la cadena ligera, por ejemplo véase WO2008/038024 incorporado aquí para referencia.

De manera adecuada, las moléculas de PEG están enlazadas covalentemente a través de un grupo tiol de al

menos un residuo de cisteína localizado en el anticuerpo. Cada molécula del polímero fijada al anticuerpo modificado puede estar enlazada covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el anticuerpo. El enlace

5 covalente generalmente será un enlace de disulfuro o, en particular, un enlace de azufre-carbono. En donde se utiliza un grupo tiol como un punto de unión de las moléculas efectoras apropiadamente activadas, se pueden utilizar por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como las

10 maleimidas y derivados de cisteína. Se puede utilizar un polímero activado como el material de partida en la preparación del anticuerpo modificado con polímeros como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo de tiol tal

15 como un ácido o un éster α -halocarboxílico, por ejemplo la yodoacetamida, una imida, por ejemplo la maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo de Nektar, inicialmente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, E.U.A.) o se pueden

20 preparar a partir de los materiales de partida comercialmente disponibles utilizando los procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que se puede obtener de Nektar, inicialmente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA

25 (que se puede obtener de Nektar, inicialmente Shearwater).

En una modalidad, el método comprende la etapa adicional de formular la molécula del anticuerpo obtenida a partir del método representado que incluye las versiones conjugadas de la misma, como una formulación farmacéutica adecuada para su uso en seres humanos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona también una etapa del proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende agregar y mezclar el anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

La molécula del anticuerpo obtenida a partir del método de la presente descripción puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes del anticuerpo, por ejemplo los anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes diferentes de los anticuerpos tales como las xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen los anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En una modalidad adicional, el anticuerpo o la composición de acuerdo con la descripción se emplea en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como el propionato de

fluticasonasa) y/o un agonista beta-2 (tal como el salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación de las células (tales como la rapamicina, ciclofosfina, metotrexato) o un inhibidor de CD28 y/o CD40 alternativo. En una modalidad, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra modalidad, el inhibidor es un anticuerpo específico para el objetivo.

Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" cuando se utilice aquí se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en los ensayos de cultivo celular o en los modelos de animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Tal información se puede utilizar entonces para determinar las dosis y rutas útiles para la administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y

el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por la
5 experimentación de rutina y está dentro del criterio del especialista clínico. De manera general, una cantidad terapéuticamente efectiva será de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo 0.1 mg kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden ser presentadas convenientemente en la forma de una
10 sola dosis que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (por ejemplo, simultánea, secuencial o
15 separadamente) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la cual se administra un anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección que va a ser tratada, por ejemplo el grado de la enfermedad/inflamación presente y de que si la molécula está
20 siendo utilizando profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media del anticuerpo y de la duración de su efecto. Si el anticuerpo tiene una vida media breve (por ejemplo de 2 a 10
25 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. De

manera alternativa, si el anticuerpo tiene una vida media prolongada (por ejemplo, de 2 a 15 días), solamente puede ser necesario dar una dosis una vez por día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

5 El portador farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas metabolizadas lentamente, grandes, tales como las proteínas,
10 polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas del virus inactivo.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como
15 los clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como los acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente
20 líquidos tales como el agua, solución salina, glicerol y etanol. De manera adicional, las sustancias auxiliares, tales como los agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadores del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores hacen posible que las
25 composiciones farmacéuticas sean formuladas como tabletas,

pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas aguadas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas adecuadas para la administración
5 incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo por inyección en el bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, se puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o
10 acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservadores, estabilizadores y/o de dispersión. De manera alternativa, la molécula de la descripción puede estar en la forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril
15 apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que van a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, en una o más modalidades las composiciones están
20 adaptadas para la administración a sujetos humanos.

De manera adecuada en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es semejante al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo, por ejemplo si el pH de la formulación es de 7 entonces un pI
25 de 8-9 o mayor puede ser apropiado. Sin que se desee que esté

limitado por la teoría, se piensa que esto puede proporcionar por último una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo permanece en la solución.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención
5 se pueden administrar por medio de cualquier número de rutas incluyendo, pero no sin estar limitada a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal,
10 intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar los hiposprays (soluciones de rociado aplicadas con aguja hipodérmica) para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. De manera típica, las composiciones terapéuticas se pueden preparar
15 como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones
20 generalmente se llevará a cabo por inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o suministrada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola
25 dosis o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será un anticuerpo. Como tal, el mismo será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por consiguiente, si la composición va a ser administrada por una ruta utilizando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan el anticuerpo contra la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que el mismo haya sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Una descripción completa de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una modalidad, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas incluyendo la inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles con dosificador que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contiene la sustancia activa pueden consistir solamente de las sustancias activas mencionadas anteriormente o de una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo glucosa o arabinosa), disacáridos

(por ejemplo lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de éstos
5 entre sí. Los mono o disacáridos se utilizan adecuadamente, el uso de la lactosa o glucosa, particularmente pero no exclusivamente en la forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor que 10 micrones, tal
10 como 1-9 micrones, por ejemplo desde 0.1 hasta 5 μm , en particular desde 1 hasta 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo) es de importancia primordial.

Los gases propulsores que se pueden utilizar para
15 preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre los hidrocarburos tales como el n-propano, n-butano o isobutano y de los halohidrocarburos tales como los derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano,
20 ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden utilizar solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG
25 12, TG 134a y TG 227. De los hidrocarburos halogenados

mencionados anteriormente, el TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y el TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y las mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

5 Los aerosoles inhalables que contienen un gas propulsor también pueden contener otros ingredientes tales como co-disolventes, estabilizadores, agentes superficialmente activos (agentes tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos
10 estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen un gas propulsor de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5 % en peso de la sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0.002 a 5 % en
15 peso, 0.01 a 3 % en peso, 0.015 a 2 % en peso, 0.1 a 2 % en peso, 0.5 a 2 % en peso o 0.5 a 1 % en peso del ingrediente activo.

De manera alternativa, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser por la administración de una
20 solución líquida o formulación en suspensión, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor de Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory
25 Equipment, Inc., Richmond, Va.).

El anticuerpo o fragmento de unión obtenido a partir del método de aquí se puede suministrar dispersado en un disolvente, por ejemplo, en la forma de una solución o una suspensión. El mismo se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, una solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución amortiguada. Las soluciones amortiguadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidroso, y 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para lograr un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, una molécula liofilizada.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de citrato, amortiguador de fosfato, amortiguador de acetato y amortiguador de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, la albúmina del suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente será provista en una forma sustancialmente estéril que emplea procesos de

fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y la esterilización por medio de la filtración del disolvente/disolución amortiguado utilizado para la
5 formulación, la suspensión aséptica de la molécula en la solución del disolvente amortiguado estéril, y la distribución de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares para aquellas personas con experiencia ordinaria en la técnica.

10 La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción puede ser provista, por ejemplo, como unidades de una sola dosis (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) empacada en sobrecitos de papel aluminio. Cada vial contiene una sola dosis en un volumen,
15 por ejemplo, de 2 ml del amortiguador del disolvente/disolución.

Que comprende en el contexto de la presente especificación está propuesto para significar que incluye. En donde se pueden combinar modalidades técnicamente
20 apropiadas de la invención. Cualquier modalidad descrita positivamente aquí se puede emplear como la base de una renuncia negativa.

La invención ahora será descrita con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales son solamente
25 ilustrativos y no deben ser considerados de ninguna manera

como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Conversión térmica de las especies multiméricas de Fab-dsFv purificadas en la proteína A

Expresión del CHO y clarificación de la A26Fab-dsFv

5 Las construcciones que se unen al OX40 humano y a la albúmina del suero que tienen la secuencia de cadena ligera A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEC ID NO:16) y la secuencia de cadena pesada A26 Fab Pesada-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEC ID NO: 15) se expresaron en una línea
10 celular del ovario del hámster chino (CHO DG44) deficiente en la dihidrofolato reductasa estable (DHFR). Esto se generó por la transfección utilizando un aparato Nucleofector (Lonza) siguiendo las instrucciones del fabricante con un vector del plásmido que contuvo tanto el gen para DHFR como un marcador
15 seleccionable y los genes que codifican el producto. Las células transfectadas se seleccionaron en un medio que carece de hipoxantina y timidina, y en la presencia del metotrexato inhibidor de DHFR.

La línea celular se cultivó en un medio que contuvo
20 metotrexato 20 nM en todas las etapas del inóculo. Las células se cultivaron entonces en la ausencia del metotrexato. La clarificación del sobrenadante se llevó a cabo por medio de centrifugación (4000 x g durante 60 minutos a temperatura ambiente) seguido por filtración intensay en
25 condiciones estériles.

Purificación con la proteína A del A26Fab-645dsFv expresada en el mamífero

Los sobrenadantes de CHO aclarados se aplicaron a una columna HiScreen de 9.4 ml (2 columnas en serie) MabSelect (GE Healthcare) equilibrada en una solución salina amortiguada con fosfato de Delbeccos (PBS) de pH 7.4. La columna se lavó con PBS y el material unido se eluyó con citrato 0.1 M a pH 3.5. El pico de elución recolectado se ajustó en el pH a ~pH 7 con Tris/HCl 2 M de pH 8.5. Las eluciones ajustadas en el pH se intercambiaron en el amortiguador en el amortiguador de fosfato en PBS a pH 7.4 utilizando concentradores de centrifugación de corte de peso molecular de 10 kDa.

Método general empleado para el análisis de SDS-PAGE no reducido de A26Fab-645dsFv

Las muestras se diluyeron a 1 mg/ml cuando se requirió en un volumen final de 50 µl y luego se agregaron 5 µl de NEM 100 mM. Las muestras se diluyeron luego con 50 µl de la solución amortiguadora de muestreo Tris-Glicina SDS (2x) de Novex y se agitaron en forma de remolino antes de incubarse a 95 °C durante 3 minutos. Las muestras preparadas se cargaron a 5 µg por pocillo en un gel de Tris/Glicina SDS acrilamida al 4-20% y se corrieron durante 120 minutos a una tensión constante de 150V.

Método general empleado para el Análisis de SDS-PAGE reducido de A26Fab-645dsFv

Las muestras se diluyeron a 1 mg/ml cuando fue necesario en un volumen final de 50 µl del agente reductor.

- 5 Las muestras se diluyeron luego con 50 µl de la solución amortiguadora de muestreo SDS Tris-Glicina Novex (2x) y se agitaron en forma de remolino antes de incubarse a 95 °C durante 3 minutos. Las muestras preparadas se cargaron en 5 µg de proteína por pocillo en un gel de Tris/Glicina SDS
- 10 acrilamida al 4-20% y se corrieron durante 120 minutos a 150 V, voltaje constante. Los geles se tiñeron con un tinte de proteína azul de Coomasie, véanse las figuras 2 y 12.

Método general para el análisis por G3000 SEC-HPLC de A26Fab-645dsFv

- 15 Se inyectaron muestras de 50 µg en una columna TSK de Gel G3000SWXL, 7.8 x 300 mm (Tosoh) y se desarrolló con un gradiente isocrático de fosfato 200 mM pH 7.0 a 1 ml/min. La detección de la señal fue por absorbancia a 280 nm, véanse las figuras 9, 10, 13 y 14. El análisis por SEC-HPLC se
- 20 utilizó para determinar tanto el % del monómero (el monómero de A26Fab-645dsFv tiene un tiempo de retención de alrededor de 9 minutos) así como un método para predecir el rendimiento del proceso de conversión. El rendimiento previsto para el proceso de conversión se calculó expresando el área del pico
- 25 total en cualquier instante del tiempo particular como un

porcentaje del área del pico total a T=0.

Conversión térmica de A26Fab-645dsFv purificado en la proteína A, a concentración constante del reductor

El A26Fab-645dsFv purificado en la proteína A a ~ 5
5 mg/ml se diluyó 1:1 en una solución amortiguadora de
conversión de PBS/bMEA (β -mercaptoetilamina) 100mM dando como
resultado una concentración final de bMEA de 50 mM. Después
de la disolución, las muestras se incubaron a una temperatura
definida. Las muestras tomadas durante el transcurso del
10 tiempo se pusieron en hielo para reducir la temperatura y
detener el proceso de conversión antes del análisis. El
análisis fue por SEC-HPLC y se determinaron el nivel del
monómero y una predicción del rendimiento.

Se observó que los niveles de monómeros aumentaron
15 en todas las temperaturas evaluadas, sin embargo, la tasa de
conversión fue significativamente más rápida a temperaturas
más altas. Por el contrario, a medida que aumentaba la
temperatura, el rendimiento previsto disminuía. Para calcular
el rendimiento total del monómero (recuperación neta), el
20 porcentaje de los niveles del monómero se dividió entre 100 y
se multiplicó por el rendimiento previsto. Los datos se
resumen en las figuras 3, 4 y 5 y en las tablas 1-3.

A las temperaturas de incubación de ≥ 55 °C, las
recuperaciones netas se reducen después de tiempos de
25 incubación relativamente breves. A ≤ 50 °C, la recuperación

neta continúa aumentando durante todo el transcurso del tiempo evaluado. Las recuperaciones netas son significativamente mayores a 45-50 °C, con 50 °C que parece óptima en 50mM bMEA.

Tabla 1 Monómero total: conversión con 50 mM BMEA

	Tiempo (horas)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	27.6	28.37	29.49	30.85	31.98	32.86	33.63	40.09	
45°C	27.6	29.46	31.12	33.51	35.62	37.39	39.11	53.00	61.01
50°C	27.6	31.48	35.95	42.18	47.2	50.6	52.98	70.84	74.29
55°C	27.6	35.94	44.49	56.76	64.04	68.71	72.68	85.74	
60°C	27.6	72.03	78.79	81.92					

Tabla 2 Rendimiento pronosticado - Conversión con bMEA 50 mM

	Tiempo (horas)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	100.0	100.1	100.3	100.0	99.3	99.4	99.9	100.8	
45°C	100.0	99.5	99.4	100.7	100.1	99.7	101.0	99.6	99.3
50°C	100.0	99.8	98.5	97.5	95.7	94.7	95.4	86.8	87.0
55°C	100.0	100.4	95.6	86.3	80.0	76.1	72.9	55.8	
60°C	100.0	57.3	50.6	44.1					

Tabla 3 Recuperación neta - Conversión con bMEA 50 mM

	Tiempo (horas)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	27.6	28.4	29.6	30.9	31.8	32.7	33.6	40.4	
45°C	27.6	29.3	30.9	33.7	35.7	37.3	39.5	52.8	60.6
50°C	27.6	31.41	35.41	41.14	45.16	47.94	50.52	61.5	64.7
55°C	27.6	36.08	42.52	48.97	51.3	52.27	52.99	47.86	
60°C	27.6	41.3	39.85	36.14					

Conversión térmica de A26Fab-645dsFv purificado en la proteína A, a temperatura constante

El A26Fab-645dsFv purificado en la proteína A a ~5 mg/ml se diluyó 1:1 en una solución amortiguadora de conversión que fue un material almacenado 2x de la concentración de bMEA establecida (1, 5, 10, 20, y 50 mM) en PBS. Después de la disolución, las muestras se incubaron a 50 °C. Las muestras tomadas durante el transcurso del tiempo se pusieron en hielo para reducir la temperatura y detener el proceso de conversión antes del análisis.

El análisis fue por SEC-HPLC y se determinaron el nivel del monómero y una predicción de rendimiento. Los datos se resumen en las figuras 6, 7 y 8 y en las tablas 4, 5 y 6.

La tasa de conversión aumentó con el aumento de las concentraciones de bMEA. La recuperación neta se estabilizó a ~65% del monómero a $\geq$ 20 horas. Las concentraciones reducidas de bMEA observaron un aumento más gradual en los niveles del monómero con poco o ningún aumento observado en bMEA 1mM durante el transcurso del tiempo.

Tabla 4 Monómero total: conversión a 50 °C y concentración de bMEA establecida

	Tiempo (horas)					
	0	1.5	5	21	28	47
1mM bMEA	27.6	27.8	28.2	30.1	30.3	31.0
5mM bMEA	27.6	29.7	33.4	40.0	41.4	42.8
10mM bMEA	27.6	32.3	39.2	49.2	51.1	54.2
20mM bMEA	27.6	35.3	44.0	59.1	61.7	66.1
50mM bMEA	27.6	41.1	52.9	74.7	76.7	79.4

Tabla 5 Rendimiento pronosticado - Conversión a 50 °C y concentración de bMEA establecida

	Tiempo (horas)					
	0	1.5	5	21	28	47
5 1mM bMEA	100.0	99.8	99.4	99.3	98.6	98.7
5mM bMEA	100.0	99.8	98.9	97.8	98.4	100.4
10mM bMEA	100.0	99.3	98.4	96.3	95.0	95.2
20mM bMEA	100.0	97.6	95.8	93.3	92.3	91.0
50mM bMEA	100.0	98.0	93.8	85.4	84.7	81.9

Tabla 6 Recuperación neta - Conversión a 50 °C y concentración de bMEA establecida

	Tiempo (horas)					
	0	1.5	5	21	28	47
1mM bMEA	27.6	27.7	28.0	29.9	29.9	30.6
5mM bMEA	27.6	29.6	33.1	39.1	40.7	42.9
15 10mM bMEA	27.6	32.1	38.6	47.4	48.6	51.6
20mM bMEA	27.6	34.5	42.2	55.1	57.0	60.2
50mM bMEA	27.6	40.2	49.6	63.8	65.0	65.0

Ejemplo 2: Conversión térmica de especies multiméricas de Fab-dsFv en el sobrenadante de cultivo celular de mamífero clarificado

Conversión térmica de A26Fab-645dsFv en el sobrenadante de cultivo celular de mamífero

El sobrenadante del cultivo celular clarificado se concentró a la mitad del volumen original usando concentradores de centrifugación de corte de peso molecular

de 10kDa. El sobrenadante concentrado se diluyó luego hasta el volumen original usando PBS/bMEA 100 mM, para proporcionar una concentración final de bMEA de 50 mM. El sobrenadante luego se incubó a 50 °C durante la noche (14.5 horas).

5 Después de la incubación, el sobrenadante se puso en hielo para reducir la temperatura y detener el proceso de conversión.

Purificación con la proteína A de A26Fab-645dsFv a partir de sobrenadante de cultivo de células de mamífero después de la
10 **conversión térmica**

El sobrenadante CHO convertido térmicamente se aplicó a una columna HiScreen de 9.4 ml (2 columnas en serie) MabSelect (GE Healthcare) equilibrada en solución salina amortiguada con fosfato de Delbeccos (PBS) pH7.4. La columna
15 se lavó con PBS y el material unido se eluyó con citrato 0.1 M a pH 3.5. El pico de elución se recolectó y el pH se ajustó a ~pH7 con Tris 2M/HCl a pH 8.5. La purificación se repitió como un control utilizando CHO sin convertir. Los materiales eluidos de la proteína A neutralizada en el pH se analizaron
20 mediante G3000 SEC-HPLC (tabla 7) y SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (figuras 11 y 12). Se encontró un pH de elución que permitió la elución del monómero de FabFv mientras que las especies multiméricas permanecieron unidas a la columna. El proceso de conversión del sobrenadante se
25 repitió y se aplicó a las columnas HiScreen de 9.4 ml y se

eluyó utilizando condiciones de elución (citrato 0.1 M, pH 3.8). También se llevó a cabo una corrida de control del sobrenadante no convertido cargado con la misma capacidad de carga. Los picos de elución se recolectaron y el pH se ajustó a ~pH7 con Tris 2M/HCl a pH 8.5. Los materiales eluidos de la proteína A neutralizada en el pH se analizaron mediante análisis de G3000 SEC-HPLC (figuras 13 y 14) y A280 (tabla 8). Se observaron niveles del monómero significativamente mayores a partir del material convertido con una recuperación comparable cuando se eluyó a pH 3.5. La calidad del producto tanto del sobrenadante con y sin la conversión fue comparable a aquella de las eluciones a pH 3.8 cuando se analizó mediante SEC-HPLC; sin embargo, se observó un aumento significativo en la cantidad de proteína después de la conversión.

Tabla 7

Muestra	% de Monómero	Proteína (mg)
Elución – Post-Conversión de la Proteína A	67.1	14.1
Elución – Sin Conversión de la Proteína A	38.6	14.9

Tabla 8

Muestra	% de Monómero	Proteína (mg)
Elución – Post-Conversión de la Proteína A a Ph 3.8	97.9	9.0
Elución – Sin Conversión de la Proteína A a Ph 3.8	98.5	4.9

El anticuerpo de alimentación utilizado para este experimento fue A26Fab-645dsFv. Todos los experimentos se realizaron en material purificado con la proteína A. El fluido de cultivo celular de A26Fab-645dsFv se purificó usando una columna con proteína A (MabSelect, GE Healthcare). El material se cargó a pH 7.4, con la mayoría de las impurezas que fluye a través de la columna mientras que fueron unidas las moléculas objetivo. La columna se eluyó entonces a pH 3.4, usando una solución amortiguadora de citrato de sodio. Esto eluyó las especies monoméricas junto con las especies multiméricas. El conjunto de elución se concentró a 13 g/l y se diafiltró en la solución amortiguadora de PBS a pH 7.4. El anticuerpo A26Fab-645dsFv de alimentación contuvo alrededor de 15% de los monómeros pre-convertidos. La concentración del anticuerpo (Concentración de alimentación g/l), el pH, la concentración del reductor de bMEA, la temperatura de la etapa de conversión y la velocidad de mezclado fueron evaluados todos, como que se muestra en la tabla 9 a continuación. El monómero, dímero, trímero, tetrámero y % de HMWS se midieron a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 23 horas mediante SE-UPLC usando una máquina fabricada por Walters que utiliza la columna BEH200 SEC 1.7 μm y son mostrados en la tabla 10 durante 5 horas.

TABLA 9 Parámetros experimentales para los experimentos N1 a N35

	Nombre Exp.	Conc. de la aliment. (g/l)	pH	Conc. del Reductor (mM)	Temperatura (°C)	Mezclado (rpm)
5	N1	0.50	5.4	5	40	100
	N2	5.00	5.4	5	40	100
	N3	0.50	8.6	5	40	100
	N4	5.00	8.6	5	40	100
	N5	0.50	5.4	100	40	100
10	N6	5.00	5.4	100	40	100
	N7	0.50	8.6	100	40	100
	N8	5.00	8.6	100	40	100
	N9	0.50	5.4	5	55	100
	N10	5.00	5.4	5	55	100
15	N11	0.50	8.6	5	55	100
	N12	5.00	8.6	5	55	100
	N13	0.50	5.4	100	55	100
	N14	5.00	5.4	100	55	100
	N15	0.50	8.6	100	55	100
20	N16	5.00	8.6	100	55	100
	N17	0.50	5.4	5	40	1200
	N18	5.00	5.4	5	40	1200
	N19	0.50	8.6	5	40	1200
	N20	5.00	8.6	5	40	1200
25	N21	0.50	5.4	100	40	1200
	N22	5.00	5.4	100	40	1200
	N23	0.50	8.6	100	40	1200
	N24	5.00	8.6	100	40	1200
	N25	0.50	5.4	5	55	1200
	N26	5.00	5.4	5	55	1200
	N27	0.50	8.6	5	55	1200
	N28	5.00	8.6	5	55	1200
	N29	0.50	5.4	100	55	1200
	N30	5.00	5.4	100	55	1200
	N31	0.50	8.6	100	55	1200
	N32	5.00	8.6	100	55	1200
	N33	2.75	6.9	52.5	47.5	650
	N34	2.75	6.9	52.5	47.5	650
	N35	2.75	6.9	52.5	47.5	650

Tabla 10 Resultados de la tabla 9 anterior a las 5 horas

Nomb. Exp.	Conc. alim. (g/l)	pH	Conc. del reductor (mM)	Temperatura (°C)	Mezclado (rpm)	HMWS	Tetrámero	Trímero	Dímero	Monómero
N1	0.50	5.4	5	40	100	11.1	13.0	22.8	28.2	24.6
N2	5.00	5.4	5	40	100	18.7	16.2	22.7	24.6	17.9
N3	0.50	8.6	5	40	100	11.4	14.3	22.2	27.4	24.8
N4	5.00	8.6	5	40	100	22.3	16.0	21.9	23.1	16.7
N5	0.50	5.4	100	40	100	3.6	6.0	17.5	33.5	39.5
N6	5.00	5.4	100	40	100	12.9	11.1	17.4	29.2	29.5
N7	0.50	8.6	100	40	100	2.7	6.1	16.9	34.2	40.2
N8	5.00	8.6	100	40	100	17.4	12.5	16.8	25.2	28.1
N9	0.50	5.4	5	55	100	0.0	1.0	6.6	30.0	62.4
N10	5.00	5.4	5	55	100	0.0	6.7	17.2	36.1	40.0
N11	0.50	8.6	5	55	100	0.0	0.0	7.9	31.0	61.1
N12	5.00	8.6	5	55	100	2.7	5.7	18.1	34.3	38.8
N13	0.50	5.4	100	55	100	0.0	0.0	0.3	3.5	95.7
N14	5.00	5.4	100	55	100	0.0	0.0	0.7	10.8	88.6
N15	0.50	8.6	100	55	100	0.0	0.0	0.1	3.5	96.5
N16	5.00	8.6	100	55	100	0.0	0.8	1.6	13.9	83.6
N17	0.50	5.4	5	40	1200	7.7	10.0	19.2	31.2	32.0
N18	5.00	5.4	5	40	1200	13.9	15.1	23.6	27.1	20.3
N19	0.50	8.6	5	40	1200	8.4	11.1	21.3	30.8	28.5
N20	5.00	8.6	5	40	1200	20.0	15.2	22.5	24.4	18.0
N21	0.50	5.4	100	40	1200	0.0	5.6	15.9	36.2	42.3
N22	5.00	5.4	100	40	1200	12.6	10.3	16.4	30.0	30.8
N23	0.50	8.6	100	40	1200	2.2	5.5	17.3	35.1	39.9
N24	5.00	8.6	100	40	1200	14.4	11.7	16.7	26.6	30.6
N25	0.50	5.4	5	55	1200	0.0	0.0	6.7	32.0	61.3
N26	5.00	5.4	5	55	1200	2.1	5.7	18.7	36.2	37.3
N27	0.50	8.6	5	55	1200	0.0	1.1	8.1	31.6	59.2
N28	5.00	8.6	5	55	1200	1.7	4.9	17.2	35.6	40.7
N29	0.50	5.4	100	55	1200	0.0	0.0	2.4	11.6	86.0
N30	5.00	5.4	100	55	1200	0.0	0.0	1.6	13.1	75.5
N31	0.50	8.6	100	55	1200	0.0	0.0	0.0	3.9	96.1
N32	5.00	8.6	100	55	1200	0.0	0.0	1.3	14.9	83.9
N33	2.75	6.9	52.5	47.5	650	1.4	2.7	9.6	30.6	55.6
N34	2.75	6.9	52.5	47.5	650	2.8	3.6	11.6	30.5	51.6
N35	2.75	6.9	52.5	47.5	650	2.4	3.4	11.0	30.3	53.0

El objetivo de la etapa de conversión es maximizar el porcentaje del monómero. En todos los intervalos investigados, los factores más significativos en el modelo en el % del monómero son la concentración y la temperatura del reductor. A mayores concentraciones del reductor y a temperaturas más altas, el % de monómero se incrementó.

Existió una tendencia observada de que hubo una correlación entre el aumento de la temperatura y el grado de precipitación.

10 **Ejemplo 4: Investigación sobre el efecto de diversos excipientes**

Los excipientes y las concentraciones investigadas en el experimento se proporcionan en la tabla 11 a continuación:

15 **Tabla 11**

mM de Glicina	mM de Serina	mM de Prolina	mM de Alanina	mM de Lisina	nM de Arginina	Polisorbato 80 (2%) v/v)	Polisorbato 20 (2%) v/v)	AmmSul (4 M)	NaCl (1.5 M)
0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0
11	11	11	17	11	17	0.4	0.4	667	167
22	22	22	33	22	33	0.7	0.7	778	250
56	56	56	83	56	83	0.9	0.9	889	333
111	111	111	167	111	167	0.1	0.1	1000	417
278	278	278	333	278	333	0.2	0.2	1111	500
556	556	556	583	556	583	0.6	0.6	1222	667
778	778	778	833	778	833	1.1	1.1	1556	833

25 Las concentraciones se muestran en mM,

excepto el polisorbato 20 y 80, que se muestran como porcentaje v/v. Los experimentos se realizaron en placas con pocillos de 2 ml de profundidad y se completaron por duplicado. Las condiciones utilizadas
5 fueron 0.5 g/l de A26Fab-dsFv, 100 mM de β -mea, los excipientes enumerados en la tabla 11 y una temperatura de 55 °C. También se realizaron experimentos en 10 muestras de control usando 0.5 g/l de A26Fab-dsFv, 100 mM de β -mea, a 55 °C sin
10 excipientes. Se realizaron experimentos sobre otros 6 controles con A26FabsFv a 0.5 g/l, una temperatura de 55 °C sin el agente reductor y sin excipientes.

Las muestras del transcurso del tiempo se tomaron a intervalos regulares. El ensayo de Bradford
15 se usó para controlar el rendimiento. El ensayo de la proteína de Bradford es un procedimiento analítico utilizado para medir la concentración de la proteína en una solución. Se encontró que la β -mea no se absorbió a 595 nm. Por lo tanto, este método se
20 utilizó para medir la concentración total de proteína y, por lo tanto, para determinar el rendimiento de la etapa. La concentración total de la proteína se determinó usando el kit de ensayo de la proteína de Bradford en un formato de 96 pocillos con la
25 transferencia del líquido realizada usando un robot

de manipulación de líquidos Tecan Freedom EVO 200 (Tecan, Reading, UK). El ensayo se calibró con un material de A26Fab-645dsFv purificado, analizado ortogonalmente por A280 nm. Las muestras se
5 prepararon y analizaron según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones desconocidas se determinaron mediante interpolación de la curva por regresión lineal.

Todos los experimentos con altos
10 rendimientos se analizaron posteriormente mediante SE-UPLC y SDS PAGE. Los aminoácidos pareció que reducen la precipitación ya que aumentaron el rendimiento en comparación con el control. Para los polisorbatos, se realizó un análisis adicional
15 mediante SDS PAGE para analizar su efecto (figura 15), las muestras fueron de la segunda selección, con alimentación de 0.5 g/l, β MEA 100 mM a 55 °C, después de 5 h. Las figuras 16a y 16b muestran datos de exclusión por tamaño para diversos excipientes a
20 diferentes condiciones.

Ejemplo 5: Investigación de parámetros en combinación con lisina

La concentración de alimentación de anticuerpo g/l, la concentración de β MEA y los
25 parámetros de temperatura se investigaron en la

presencia de lisina 0.7 M y en la ausencia de lisina. Los experimentos se realizaron en placas con pocillos de 2 ml de profundidad y se completaron por duplicado. Se usaron tubos Eppendorf de 2 ml y cada
 5 etapa de conversión se llevó a cabo durante 5 horas en un baño de agua.

Tabla 12 Diseño experimental alternativo para investigar los factores, los intervalos y las respuestas

10

15

20

Nombre Exp.	Conc. Alím. (g/l)	Conc. de β -mea (mM)	Temperatura (°C)
N1	0.50	50	50
N2	5.00	50	50
N3	0.50	100	50
N4	5.00	100	50
N5	0.50	50	55
N6	5.00	50	55
N7	0.50	100	55
N8	5.00	100	55
N9	0.50	75	53
N10	5.00	75	53
N11	2.75	50	53
N12	2.75	100	53
N13	2.75	75	50
N14	2.75	75	55
N15	2.75	75	53
N16	2.75	75	53
N17	2.75	75	53

Tabla 13 Resultados para la tabla 12 anterior sin lisina

Nombre Exp.	Conc. Alim. (g/l)	Conc. β -mea (mM)	Temperatura (°C)	% de monómero	% de Rendim.	Rendimiento del % del monómero
N1	0.50	50	50.0	74.2	80.2	59.5
N2	5.00	50	50.0	69.0	78.2	53.9
N3	0.50	100	50.0	85.8	71.6	61.4
N4	5.00	100	50.0	75.7	61.1	46.2
N5	0.50	50	55.0	90.0	27.1	24.4
N6	5.00	50	55.0	81.8	5.8	4.7
N7	0.50	100	55.0	83.3	7.8	6.5
N8	5.00	100	55.0	69.6	1.4	1.0
N9	0.50	75	52.5	92.7	42.4	39.3
N10	5.00	75	52.5	82.9	14.4	12.0
N11	2.75	50	52.5	85.7	42.8	36.7
N12	2.75	100	52.5	85.5	13.9	11.9
N13	2.75	75	50.0	78.8	82.3	64.9
N14	2.75	75	55.0	77.2	3.8	2.9
N15	2.75	75	52.5	86.9	24.3	21.1
N16	2.75	75	52.5	86.8	24.3	21.1
N17	2.75	75	52.5	86.1	25.3	21.8

Cuando la lisina 0.7M estuvo presente, la temperatura tuvo el efecto más fuerte sobre el % del monómero, que se observa aún más a temperaturas más altas.

Ejemplo 6: Investigación de diferentes agentes reductores

Para el experimento inicial de selección del reductor, se utilizó una temperatura de 50 °C para abrir la molécula. La alimentación fue A26Fab-dsFv purificado, concentración 1 g/l y 15% del monómero. El experimento se realizó en tubos de Eppendorf con un volumen de alimentación

de 1 ml. Las concentraciones del reductor detectadas fueron de 10, 50 y 100 mM (tabla 15).

Las muestras se calentaron y se mezclaron utilizando un instrumento Vortemp de Thermo Scientific. El muestreo se realizó después de la adición del reductor, pero antes del calentamiento, y después de 2 h de calentamiento a 50 °C. Se usó β -mea como el reductor de control para este experimento.

Tabla 15: Reductor inicial y condiciones investigadas

10

15

REDUCTOR	CONC. PROBADA mM	TEMP. °C	CONC. DE LA ALIMENT.	VELOCIDAD DE MEZC.
TCEP	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm
DTT	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm
Acido fosforoso	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm
Acido ascórbico	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm
Sulfato de metilo sódico	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm
Sulfito de etileno	10, 50 y 100	50	1 g/l	1200 rpm

El rendimiento se calculó utilizando el área del pico en el ensayo de SE UPLC. El área total del pico de la muestra se dividió entre el área total del pico del material de alimentación. El rendimiento del monómero se calculó multiplicando el porcentaje de monómero por el rendimiento total. La figura 17a muestra el % del monómero cuando el tratamiento se realizó a temperatura

ambiente y la figura 17b muestra los resultados después de 2 horas para los experimentos correspondientes realizados a 50 °C.

Las figuras 18a y 18b muestran los resultados de un análisis correspondiente realizado por SE-HPLC.

Ejemplo 7: Conversión a escala de 2 l

La expresión del CHO y la clarificación de la A26Fab-645dsFv se llevaron a cabo como en el ejemplo 1 para proporcionar un fluido de cultivo aclarado como la alimentación para el experimento a escala de 2 l. Se llevó a cabo un experimento de conversión en un recipiente de fermentación de 2 l, utilizando un volumen de conversión de 2 l. La alimentación para el experimento fue el fluido de cultivo celular clarificado (CCF), la concentración del anticuerpo fue de 2.2 g/l, de la cual 30 % fue del monómero. Las condiciones experimentales se muestran en la tabla 16, la etapa de conversión se llevó a cabo durante 17 h en todos los experimentos. Las muestras fueron analizadas por SE UPLC.

Tabla 16: Condiciones experimentales para los experimentos de conversión de 2 l

pH	Calentamiento °C	Conc. de β -mea (mM)
7	50	50

Tabla 17: Resultados experimentales para un experimento de conversión de 2 l

Carga de CCF pre-conversión				Post-conversión de CCF					
Conc. (g/l)	Carga de Ab (g)	% de monó- mero	Carga de monómero (g)	Conc. (g/l)	Ab recupe- rado (g)	Rend. del Ab (%)	% de monó- mero	Monóm. recup. (g)	Rend. del monóm. (%)
2.04	4.40	30.2	1.33	1.73	3.73	84.8	50.9	1.90	142.9

Fue posible escalar hacia arriba la etapa de conversión hasta una escala de 2 l, en los recipientes representativos de aquellos utilizados a la escala de fabricación. Fue posible aumentar significativamente la cantidad de monómero a través de las etapas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.