

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un método para aumentar el porcentaje del monómero en una composición de moléculas del anticuerpo expresadas de manera recombinante, en donde 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 conectados directa o indirectamente por medio de uno o más enlazadores y son estabilizados por medio de un enlace de disulfuro entre los mismos, caracterizado porque comprende:

a) una etapa de conversión térmica manteniendo la composición que comprende la molécula del anticuerpo a una 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.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la temperatura está en el intervalo de 45 a 55 °C, por ejemplo de 50 a 55 °C.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la temperatura es de 50 °C.

4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el agente reductor se selecciona del grupo que comprende: glutatión (GSH), sulfito de etilo, 2-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetilamina (BMEA), cisteína-HCl y ditiotreitól (DTT).

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el agente reductor se selecciona del 2-mercaptoetanol (BME) y la 2-mercaptoetilamina (BMEA), en

particular la 2-mercaptoetilamina.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la concentración del agente reductor está en el intervalo de 1mM a 100mM, por ejemplo de 30 a 90mM, de 60 a 90 mM o de 70 a 80 mM.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el período está en el intervalo de 1 a 70 horas, por ejemplo de 3 a 10 horas, tal como de 4 a 6 horas, en particular de 5 horas.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la etapa a) se realiza a una temperatura en el intervalo de 45 a 55 °C, durante un período de 4 a 6 horas y en la etapa b) el agente reductor es BMEA o BME y está a una concentración en el intervalo de 60 a 90 mM.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque 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 mM, por ejemplo, 75 mM.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el agente reductor se emplea en la presencia de un aminoácido.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el aminoácido se selecciona de la arginina, lisina y prolina.

12. El método de conformidad con la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque la concentración del aminoácido está en el intervalo de 0.01 a 1.0 M, por ejemplo, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 M.

13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el anticuerpo está a una concentración en el intervalo de 0.5

g/l a 5 g/l en la composición, por ejemplo 2 a 3 g/l.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la etapa térmica se lleva a cabo en la presencia de agitación concomitante.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la velocidad de agitación está en el intervalo de 100 a 1200 rpm.

16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque se añade un agente reductor a la composición del anticuerpo recombinante antes de que la temperatura se eleve para que esté en el intervalo de 40 a 60 °C.

17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque se añade un agente reductor a la composición del anticuerpo recombinante después de que la temperatura está en 40 a 60 °C.

18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque comprende la etapa adicional de la purificación posterior.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el procesamiento posterior comprende la etapa de cromatografía.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la cromatografía es la cromatografía de interacción hidrofóbica.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la cromatografía es la cromatografía de intercambio iónico.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque 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.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el VH y el VL están conectados directamente por medio de un enlazador.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo se selecciona de un dsscFv, un Fab-2xdsscFv, un Fab-dsscFv-dsFv, un Fab-dsscFv-sdAb, un Fab-dsscFv-scFv y un Fab-dsscFv.

25. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado porque cada VH y VL comprende un enlazador que conecta indirectamente el VH y el VL por medio de un segundo anticuerpo.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el anticuerpo es un Fab-dsFv.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26 en donde el anticuerpo es una proteína de fusión del anticuerpo biespecífico que se une al OX40 humano y a la albúmina del suero humano, caracterizado porque 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.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el primer dominio variable de la cadena pesada (V_H1) comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:1 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 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 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.