

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 996 232**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 17192342 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024 EP 3279214**

(54) Título: **Método para la producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina**

(30) Prioridad:

29.10.2010 US 408228 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2025

(73) Titular/es:

**ABLYNX NV (100.00%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

(72) Inventor/es:

**BRIGÉ, ANN;
WALCARIUS, BART;
MEYVIS, YVES y
SERGI, MAURO**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 996 232 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la expresión de dominios variables únicos de inmunoglobulina en células hospedadoras da como resultado una variante relacionada con el producto que comprende al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método mejorado para la fabricación de inmunoglobulinas, en particular dominios variables únicos de inmunoglobulina. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina homogéneos en los que la proporción de variantes carbamiladas está fuertemente reducida o ausente. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina producidos según la invención son superiores en términos de homogeneidad del producto debido a que la variante carbamilada relacionada con el producto está reducida o ausente. Esto es beneficioso, por ejemplo, en el contexto de una aplicación terapéutica del dominio variable único de inmunoglobulina. Por lo tanto, la presente solicitud también describe dominios variables únicos de inmunoglobulina mejorados para uso terapéutico, obtenibles mediante métodos de la presente invención.

20 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

Para aplicaciones terapéuticas, las inmunoglobulinas deben ser de muy alta calidad del producto. Esto requiere, entre otras cosas, homogeneidad en términos estructurales. Además, los costes de producción están muy influidos por las dificultades encontradas durante el proceso de producción. Los bajos rendimientos o la falta de homogeneidad afectarán en general a la economía del proceso de producción y, por tanto, a los costes del terapéutico. Por ejemplo, las dificultades para separar variantes estructurales de la proteína deseada requerirán estrategias de purificación complejas y costosas.

30 Entre otros requisitos, las proteínas terapéuticas deben ser completamente funcionales. La función de la proteína depende, entre otros factores, de la estabilidad química y física de la proteína durante la fermentación y purificación.

35 La inestabilidad química puede ser causada, entre otros, por desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, formación de piroglutamato, carbamilación, eliminación beta y/o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede ser causada por la desnaturización, agregación, precipitación o adsorción de anticuerpos. Entre ellas, se sabe que la agregación, desamidación y oxidación son las causas más comunes de la degradación de anticuerpos (Cleland et al., 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377).

40 Se ha informado de la limitación de obtener rendimientos adecuados de producto funcional para inmunoglobulinas convencionales y sus fragmentos en una amplia gama de sistemas de expresión, incluyendo, entre otros, traducción *in vitro*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de ovario de hámster chino, sistemas de baculovirus en células de insectos y *P. pastoris* (Ryabova et al., Nature Biotechnology 15: 79, 1997; Humphreys et al., FEBS Letters 380: 194, 1996; Shusta et al., Nature Biotech. 16: 773, 1998; Hsu et al., Protein Expr. & Purif. 7: 281, 1996; Mohan et al., Biotechnol. & Bioeng. 98: 611, 2007; Xu et al., Metabol. Engineer. 7: 269, 2005; Merk et al., J. Biochem. 125: 328, 1999; Whiteley et al., J. Biol. Chem. 272: 22556, 1997; Gasser et al., Biotechnol. Bioeng. 94: 353, 2006; Demarest y Glaser, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 11(5): 675-87, 2008; Honegger, Handb. Exp. Pharmacol. 181: 47-68, 2008; Wang et al., J. Pharm. Sci. 96(1): 1-26, 2007).

50 En contraste con estas dificultades observadas, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden expresarse fácilmente en una forma completamente funcional en diferentes células hospedadoras, como *E. coli* o *P. pastoris*, a una tasa y nivel suficientes. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina se caracterizan por la formación del sitio de unión al antígeno por un único dominio variable, que no requiere interacción con un dominio adicional (por ejemplo, en forma de interacción VH/VL) para el reconocimiento del antígeno. La producción de Nanobodies, como un ejemplo específico de un dominio variable único de inmunoglobulina, se ha descrito ampliamente, por ejemplo, en el documento de patente WO 94/25591.

55 El problema de obtener cantidades suficientes de producto funcional es, por lo tanto, desconocido para dominios variables únicos de inmunoglobulina.

60 **SUMARIO**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.

Sorprendentemente, a pesar del buen rendimiento y funcionalidad, se ha observado una variante relacionada con el producto en la expresión de dominios variables únicos de inmunoglobulina en células hospedadoras. La presente invención se refiere a métodos mejorados de producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina, caracterizados por la reducción o ausencia de la variante relacionada con el producto.

5 Los presentes inventores han observado inesperadamente que, a pesar del alto rendimiento y funcionalidad de los dominios variables únicos de inmunoglobulina producidos en células hospedadoras, hay una fracción cuantitativamente significativa del producto que representa una variante estructural. Un análisis adicional de esta variante reveló que, inesperadamente, una fracción del producto comprende al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino. El hallazgo de cantidades considerables de una variante de este tipo fue completamente inesperado en la producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina.

10 Por lo tanto, la invención se deriva de identificar y caracterizar la variante relacionada con el producto en primer lugar. Basándose en la caracterización completa de la variante relacionada con el producto observada, los inventores establecieron que la variante comprendía al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino, más específicamente un grupo carbamilamino aminoterminal y/o al menos un grupo carbamilamino en una cadena lateral de un residuo de lisina y/o arginina.

15 Posteriormente, se proporcionan métodos que reducen o eliminan la variante carbamilada relacionada con el producto. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos de producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina que superan este problema inesperado.

20 La invención es como se expone en las reivindicaciones.

25 Más específicamente, la presente solicitud describe métodos de reducción de la carbamilación de dominios variables únicos de inmunoglobulina. Dichos métodos pueden residir en la adaptación de las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, en términos de pH, tiempo, temperatura, velocidad de alimentación y/o composición de metanol, pO₂ (concentración de oxígeno disuelto) y/o componentes del medio, tales como la velocidad de alimentación y/o composición de glicerol, en particular en términos de pH; y/o en la adaptación de las condiciones de purificación, en términos de pH, temperatura, tiempos de retención y/o uso de (co)disolventes, en particular en términos de pH.

30 Además, la presente invención proporciona métodos de eliminación de variantes carbamiladas, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico.

35 Más específicamente, la presente divulgación se refiere a métodos de producción de un dominio variable único de inmunoglobulina en una célula hospedadora que comprende
 a) aplicar condiciones que eviten la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular la carbamilación de uno o más grupos aminoacídicos, en dominios variables únicos de inmunoglobulina, o
 b) eliminar los dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino, o
 40 c) una combinación de (a) y (b).

45 Se describen métodos como se exponen anteriormente, en donde las condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular la carbamilación de uno o más grupos aminoacídicos, en dominios variables únicos de inmunoglobulina se seleccionan de uno o más de los siguientes:

- a) adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes:
 - o adaptar el pH del cultivo, preferiblemente el pH de inducción, en particular bajando el pH del cultivo, preferiblemente el pH de inducción, en comparación con el pH de cultivo e inducción estándar para el organismo hospedador, tal como bajando el pH del cultivo, preferiblemente el pH de inducción, para *Pichia pastoris*, a un pH de aproximadamente 6,45 o menos, un pH de aproximadamente 6,4 o menos, un pH de aproximadamente 6,3 o menos, un pH de aproximadamente 6,25 o menos, un pH de aproximadamente 6,2 o menos, un pH de aproximadamente 6,1 o menos, un pH de aproximadamente 6 o menos, un pH de aproximadamente 5,7 o menos, un pH de aproximadamente 5,6 o menos, un pH de aproximadamente 5,5 o menos, un pH de aproximadamente 5 o menos, en particular de aproximadamente 5, 5,45, 5,5, 5,64, 5,75, 6, 6,04, 6,05, 6,1, 6,2, 6,25, 6,4 o 6,45;
 - o adaptar el tiempo de cultivo, en particular el tiempo de lote (alimentado con glicerol) y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, en particular reducir el tiempo de cultivo, en particular el tiempo de lote (alimentado con glicerol) y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, por ejemplo, en un 30-80%, en comparación con el cultivo estándar, el tiempo de lote (alimentado con glicerol) y el tiempo de inducción para el organismo hospedador, tal como reducir el tiempo de inducción, para una *Pichia pastoris*, de aproximadamente 96 horas a un período de entre 24 y 96 horas, en particular a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 56 horas, aproximadamente 64 horas, aproximadamente 72 horas,

- aproximadamente 80 horas, aproximadamente 88 horas o aproximadamente 96 horas; o reducir el tiempo de lote alimentado con glicerol, para *Pichia pastoris*, de aproximadamente 16 a 18 horas a un período de entre 2 y 4 horas;
- 5 o adaptar la temperatura de cultivo, preferiblemente la temperatura de inducción, en particular bajando la temperatura de cultivo, preferiblemente la temperatura de inducción, por ejemplo en 1 a 15°C, tal como en 5°C o en 10°C, en comparación con la temperatura de cultivo e inducción estándar para el organismo hospedador, tal como bajando la temperatura de inducción, para *Pichia pastoris*, desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 27,5°C, 27°C, 26,5°C, 26°C, 25,5°C, 25°C, 24,5°C, 24°C, 24,5°C, 23°C, 22°C o 20°C;
- 10 o adaptar la saturación de oxígeno (concentración de oxígeno disuelto) del medio de cultivo, preferiblemente durante la inducción, en particular disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto, por ejemplo 0,3 a 0,8 veces, en comparación con la concentración de oxígeno disuelto estándar para el hospedador respectivo, tal como disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto del 30% a un intervalo entre el 5% y el 24%, por ejemplo, al 5%, al 15% o al 22,5%, para *Pichia pastoris*,
- 15 o adaptar la composición de alimentación de glicerol, preferiblemente durante la inducción, en particular disminuyendo el porcentaje de sustrato complejo (extracto de levadura y/o peptona) en la alimentación de glicerol en comparación con el porcentaje estándar de sustrato complejo en la alimentación de glicerol para el organismo hospedador, por ejemplo, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 5%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 15%, a aproximadamente el 10% o a aproximadamente el 5%, para *Pichia pastoris*, y/o adaptar la tasa de alimentación de glicerol, en particular disminuyendo la tasa de alimentación de glicerol en un 30% a un 80% en comparación con la tasa de alimentación de glicerol estándar para el hospedador respectivo,
- 20 o adaptar los parámetros de inducción que incluyen, pero sin limitación, la adaptación de la tasa de alimentación de metanol y/o la composición de alimentación de metanol para hospedadores que requieren una alimentación de metanol, en particular aumentar o disminuir la tasa de alimentación de metanol en un 30% a un 80% en comparación con la tasa de alimentación de metanol estándar para el hospedador respectivo,
- 25 o y/u optimizar la composición del medio de cultivo, preferiblemente durante la inducción, que incluye, pero sin limitación, el uso de medio libre de cianato, la adición de extracto de levadura y/o peptona, o cualquier combinación de los mismos,
- 30 b) adaptar las condiciones de purificación mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: disminución del pH, disminución de la temperatura, optimización del medio de purificación, que incluye, pero sin limitación, evitar disolventes o codisolventes que contengan cianato, tales como urea y similares, disminución de los tiempos de retención y/o almacenamiento, o cualquier combinación de los mismos; y
- 35 c) combinaciones de cualquiera de las condiciones especificadas en a) y b).
- 40 La divulgación también se refiere a métodos como se ha expuesto anteriormente, en donde las medidas anteriores se toman en al menos una etapa de producción del dominio variable único de inmunoglobulina, por ejemplo, en la etapa de cultivo del hospedador para producir el dominio variable único de inmunoglobulina, en particular en el lote, el lote alimentado o la fase de inducción; en el caldo de cultivo después de la fermentación; en el sobrenadante que comprende el dominio variable único de inmunoglobulina después de la eliminación del hospedador; en cualquier etapa de purificación del dominio variable único de inmunoglobulina; o en la etapa del dominio variable único de inmunoglobulina purificada.
- 45
- 50 En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, las condiciones que eliminan dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino, son técnicas cromatográficas, en particular técnicas cromatográficas basadas en cambios en pl y/o hidrofobia, tales como cromatografía de intercambio iónico (IEX) (por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento con intercambio iónico (IEX-HPLC); cromatografía de modo mixto; cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC); cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y similares, preferentemente cromatografía de intercambio iónico (IEX)).
- 55 En el método de la invención, el hospedador es *Pichia pastoris*.
- 60 El presente método de la invención produce dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden o consisten esencialmente en, pero sin limitación, un dominio variable único de inmunoglobulina que es una secuencia de dominio variable de cadena ligera o una secuencia de dominio variable de cadena pesada, más específicamente un dominio variable único de inmunoglobulina que es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o una secuencia de dominio variable de cadena pesada que deriva de un anticuerpo de cadena pesada, en particular, un dominio variable único de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para uso como dominio variable único de inmunoglobulina) que es un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para uso como anticuerpo de dominio), un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para uso como un dAb) o un Nanobody (que incluye, pero sin limitación, a una secuencia de VH), preferiblemente un Nanobody.
- 65

El método según la presente invención como se describe anteriormente comprende al menos las etapas de cultivo del hospedador para producir el dominio variable único de inmunoglobulina que comprende:

- 5 i) cultivar dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique,
- ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina,
- iii) opcionalmente seguido de: aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio.

10 La solicitud describe métodos como se describió anteriormente, en donde las condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos amino, en dominios variables únicos de inmunoglobulina, se aplican en una o más de la etapa i), etapa ii), después de la etapa ii), o en o después de la etapa iii), preferiblemente en la etapa ii). La invención proporciona métodos en donde se aplican condiciones que eliminan dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino, después de la etapa ii).

15 La solicitud también describe dominios variables únicos de inmunoglobulina obtenibles por cualquiera de los métodos establecidos en el presente documento, composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden dichos dominios variables únicos de inmunoglobulina, y usos terapéuticos de los dominios variables únicos de inmunoglobulina o métodos de tratamiento que comprenden el uso de los dominios variables únicos de inmunoglobulina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Figura 1. Cromatogramas de RP-HPLC de muestras de caldo clarificadas tomadas después de 19 horas (A) y después de 92,70 horas (B) de inducción (hai) en la condición de fermentación número 032 (véase la Tabla 1) de Nanobody A (NbA) que muestra un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody A con una diferencia de masa de -18 dáltones (NbA -18 Da) (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA); recuadro: ampliación de los picos principales).

25 Figura 2. Cromatogramas de RP-HPLC de muestras de caldo clarificadas tomadas después de 17,2 (A) y después de 82,60 (B) horas después de la inducción (hai) en la condición de fermentación número 017 (véase la Tabla 1) de Nanobody A (NbA) que muestra un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody A con una diferencia de masa de -18 dáltones y una variante relacionada con Nanobody A con una diferencia de masa de +43 dáltones (NbA -18 Da y NbA +43 Da) y un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody A con una diferencia de masa de dos veces +43 dáltones (NbA 2×+43 Da) (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA); panel superior: superposición de los cromatogramas de A y B).

30 Figura 3. Electroferogramas de cIEF obtenidos en el intervalo de pH 8-10,5 de un lote de referencia de Nanobody A (A) y de Nanobody A carbamilado (Nanobody de muestra A-017CV) (B). El cambio en el tiempo de retención del pico principal es causado por diferencias en el tampón de los dos lotes (eje X: posición de píxeles (posición en capilar, intervalo de pH 8-10,5); eje Y: absorbancia en unidades de absorbancia (UA)).

35 Figura 4. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC de lotes de Nanobody A tomados directamente después de la obtención (A) y después de la purificación (B) que muestran una disminución en el pico posterior en el material purificado (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA); recuadro: ampliación de los picos principales).

40 Figura 5. Espectros deconvolucionados de MaxEnt1 de los picos observados durante el análisis de LC-MS de lotes de Nanobody A tomados directamente después de la obtención (A) y después de la purificación (B) que demuestra la ausencia de Nanobody A carbamilado en el material purificado (eje X: masa en dáltones (Da); eje Y: (%)).

45 Figura 6. Los cromatogramas de RP-HPLC de lotes de Nanobody A antes (A) y después de (B) de la etapa chromatográfica de intercambio catiónico durante el procesamiento aguas abajo que muestran una disminución en el pico posterior en el material purificado (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA); recuadros en A y B: ampliación de los picos principales).

50 Figura 7. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC de lotes de Nanobody A tratados con CM, urea 1 M, 4 M u 8 M (como se indica) y de Nanobody A carbamilado (Nanobody de muestra A-017CV) que muestran un aumento en el pico posterior en función de la concentración de urea y la aparición de un pico posterior adicional a alta concentración de urea (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

55

Figura 8. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC de muestras de cultivo libres de células purificadas en CEX tomadas 96 horas después de la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody B (NbB) a pH 6,5 (línea discontinua) y pH 5 (línea sólida) que indica un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody B con una diferencia de masa de +43 dáltones (NbB +43 Da) y un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody B con una diferencia de masa de -18 dáltones (NbB -18 Da) (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA); recuadro: ampliación de los picos principales).

Figura 9. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC a partir del análisis de LC-MS de referencia de Nanobody B (línea sólida) y Nanobody B incubado en urea 1 M durante 3 días a temperatura ambiente (línea discontinua). Las variantes con RRT 1,05 y RRT 1,06 contenían especies de +43 Da correspondientes a variantes monocarbamiladas (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

Figura 10. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC de muestras de cultivo libres de células purificadas mediante cromatografía de modo mixto tomada 118 horas después de la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody C (NbC) a pH 7 (línea discontinua) y pH 6,4 (línea sólida), lo que indica un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody C con una diferencia de masa de +43 dáltones (NbC +43 Da). (Eje x: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

Figura 11. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC a partir del análisis de LC-MS de referencia de Nanobody C (línea sólida) y Nanobody C incubado en urea 4 M durante 3 días a temperatura ambiente (línea discontinua). La variante a un RRT de 1,04 contiene especies de +43 Da y +86 Da correspondientes a variantes mono- y bicarbamiladas, respectivamente. (Eje x: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

Figura 12. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC a partir del análisis de LC-MS de muestras de cultivo libres de células purificadas en proteína A tomadas 96 horas después de la inducción durante la fermentación de Nanobody D (NbD) a pH 7 y pH 6,25 (como se indica por las flechas) que indica un pico posterior que representa una variante relacionada con Nanobody D con una diferencia de masa de +43 dáltones (NbD +43 Da). (Eje x: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de la luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

A menos que indique o defina de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que será evidente para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales, tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2.^a edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6.^a Ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10.^a Ed. Blackwell Publishing, GB (2001); y Janeway et al., "Immunobiology" (6.^a ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), así como a los antecedentes de la técnica generales citados en el presente documento.

Dominio variable único de inmunoglobulina

La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina", usado indistintamente con "dominio variable único", define moléculas en donde el sitio de unión al antígeno está presente en, y se forma por, un único dominio de inmunoglobulina. Esto diferencia los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL) interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación del sitio de unión al antígeno.

Por el contrario, el sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina se forma mediante un único dominio VH o VL. Por tanto, el sitio de unión al antígeno de un dominio variable único de inmunoglobulina se forma mediante no más de tres CDR.

Por tanto, las expresiones "dominio variable único de inmunoglobulina" y "dominio variable único" no comprenden inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos, que requieren la interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión al antígeno. Sin embargo, estas expresiones comprenden fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en donde el sitio de unión al antígeno se forma mediante un único dominio variable.

Generalmente, los dominios variables únicos serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones estructurales (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de dicha secuencia de aminoácidos (que entonces normalmente contendrá al menos algunos de los residuos aminoacídicos que forman al menos una de las CDR, como se describe más adelante en el presente documento). Dichos dominios variables únicos y fragmentos son lo más preferentemente de modo que comprenden un pliegue de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un pliegue de inmunoglobulina. Como tal, el dominio variable único puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, una secuencia VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (por ejemplo, una secuencia VH o secuencia VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una única unidad de unión al antígeno (es decir, una unidad de unión al antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable único, de modo que el dominio de unión al antígeno único no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión al antígeno funcional, como es, por ejemplo, el caso de los dominios variables que están presentes en, por ejemplo, anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interactuar con otro dominio variable - por ejemplo, a través de una interacción VH/VL - para formar un dominio de unión al antígeno funcional).

Por ejemplo, el dominio variable único de un dominio variable único de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dominio variable único de inmunoglobulina) puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio (único)), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un Nanobody (como se define en el presente documento, e incluyendo, pero sin limitación, una secuencia VHH) [Nota: Nanobody® y Nanobodies® son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V.]; otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de dominio (único), también se hace referencia al estado de la técnica citado en el presente documento, así como al documento de patente EP 0 368 684. Para el término "dAb" se hace referencia, por ejemplo, a Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), a Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11) :484-490; así como, por ejemplo, a los documentos de patente WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe tenerse en cuenta que, aunque menos preferidos en el contexto de la presente invención debido a que no son de origen mamífero, los anticuerpos de dominio (único) o dominios variables únicos pueden derivar de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios de IgNAR", véase, por ejemplo, el documento de patente WO 05/18629).

En particular, la secuencia de aminoácidos de la divulgación puede ser un Nanobody o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción adicional de VHH y Nanobodies, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans en Reviews in Molecular Biotechnology 74(2001), 277-302; así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes de la técnica generales: WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; WO 01/90190 del Consejo Nacional de Investigación de Canadá; WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Instituto de Anticuerpos; así como WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825 de Ablynx N.V. y las solicitudes de patente publicadas por Ablynx N.V. También se hace referencia al estado de la técnica adicional mencionado en estas solicitudes y, en particular, a la lista de referencias mencionada en las páginas 41-43 de la solicitud Internacional WO 06/040153. Como se describe en estas referencias, los Nanobodies (en particular las secuencias VHH y Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos de Hallmark" en una o más de las secuencias estructurales. Una descripción adicional de los Nanobodies, incluyendo la humanización y/o camelización de Nanobodies, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de Nanobody", construcciones multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitantes de secuencias conectoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobodies y sus preparaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos de patente WO 08/101985 y WO 08/142164.

Por lo tanto, en el significado de la presente invención, la expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" o "dominio variable único" comprende polipéptidos que derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camello. Pueden humanizarse, como se describió anteriormente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes no camélidas, por ejemplo, ratón o humano, que han sido "camelizados", como se describió anteriormente. A menos que se indique lo contrario, el término "secuencia de inmunoglobulina" - ya sea que se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo convencional de 4 cadenas - se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo, pero sin limitación, dominios de unión al antígeno o fragmentos tales como los dominios VHH o los dominios VH/VL, respectivamente). Las expresiones moléculas de unión al antígeno o proteína de unión al antígeno se usan indistintamente con secuencia de inmunoglobulina e incluyen Nanobodies.

En un aspecto de la invención, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son secuencias del dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, una secuencia VL) o secuencias del dominio variable de la cadena pesada (por

ejemplo, una secuencia VH); más específicamente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser secuencias del dominio variable de la cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias del dominio variable de la cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

5 Los dominios variables únicos de inmunoglobulina proporcionados por la invención están preferentemente en forma esencialmente aislada (como se define en el presente documento), o forman parte de una proteína o polipéptido, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina y que opcionalmente pueden comprender además una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas unidas opcionalmente a través de uno o más conectores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden usarse como unidad de unión en dicha proteína o polipéptido, que opcionalmente pueden contener una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir, contra una o más dianas), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico, respectivamente, todo como se describe en el presente documento. Dicha proteína o polipéptido también puede estar en forma esencialmente aislada (como se define en el presente documento).

10 15 El método de la invención puede producir dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humana y de camélido, que incluyen secuencias de inmunoglobulina completamente humana, humanizada o químérica, secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizada , o dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizada, por ejemplo, dAb camelizado como se describe por Ward et al (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Además, la divulgación comprende secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo, que forman una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001, así como, por ejemplo, los documentos de patente WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden marcas u otros restos funcionales, por ejemplo, toxinas, marcas, radioquímicos, etc.

20 30 Puede considerarse - sin, sin embargo, limitarse a éstos - que la secuencia de aminoácidos y la estructura de una secuencia de inmunoglobulina, en particular un Nanobody, comprenden cuatro regiones estructurales o "FR", que se denominan en la técnica y en el presente documento "región estructural 1" o "FR1"; "región estructural 2" o "FR2"; "región estructural 3" o "FR3"; y "región estructural 4" o "FR4", respectivamente; que son regiones estructurales interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Según la invención, la expresión dominios variables únicos de inmunoglobulina también engloba construcciones que comprenden dos o más unidades de unión al antígeno en forma de dominios variables únicos, como se describe anteriormente. Por ejemplo, se pueden unir dos (o más) dominios variables únicos de inmunoglobulina con la misma especificidad de antígeno o diferente para formar, por ejemplo, una construcción bivalente, trivalente o multivalente. Mediante la combinación de dominios variables únicos de inmunoglobulina de dos o más especificidades, se pueden formar construcciones biespecíficas, triespecíficas, etc. Por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina puede comprender dos o tres dominios variables únicos de inmunoglobulina dirigidos contra la misma diana, o dos dominios variables únicos de inmunoglobulina dirigidos contra la diana A, y un dominio variable único de inmunoglobulina contra la diana B. Dichas construcciones y modificaciones de las mismas, que el experto puede prever fácilmente, están englobadas por el término dominio variable único de inmunoglobulina como se usa en el presente documento.

35 40 45 50 55 El número total de residuos aminoacídicos en un Nanobody puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente 112-115, y es más preferiblemente 113. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las partes, fragmentos, análogos o derivados (como se describen con más detalle en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que dichas partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales expuestos brevemente en el presente documento y también sean preferiblemente adecuados para los fines descritos en el presente documento.

Además, el término "secuencia", como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de dominio variable único", "secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina", "secuencia VHH" o "secuencia de proteína"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como secuencias del ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Hospedadores

60 65 Los términos "hospedador" y "células hospedadoras" se usan indistintamente. Los métodos de la presente invención pueden usar cualquier hospedador de *P. pastoris* sin limitación, siempre que sean adecuados para la producción de un dominio variable único de inmunoglobulina. En particular, la presente invención se refiere a hospedadores de *P. pastoris* que producen dominios variables únicos de inmunoglobulina, en donde una parte del dominio variable único de inmunoglobulina producido comprende al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en particular al menos un grupo carbamilamino.

El hospedador de *P. pastoris* para uso en los métodos de la presente invención será capaz de producir un dominio variable único de inmunoglobulina. Normalmente se modificará genéticamente para comprender una o más secuencias del ácido nucleico que codifican uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina. Ejemplos no limitantes de modificaciones genéticas comprenden la transformación, por ejemplo, con un plásmido o vector, o la transducción con un vector vírico. Algunos hospedadores pueden modificarse genéticamente mediante técnicas de fusión. Las modificaciones genéticas incluyen la introducción de moléculas del ácido nucleico separadas en un hospedador, por ejemplo plásmidos o vectores, así como modificaciones directas del material genético del hospedador, por ejemplo, mediante la integración en un cromosoma del hospedador, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. A menudo se producirá una combinación de ambos, por ejemplo, un hospedador se transforma con un plásmido, que, tras la recombinación homóloga (al menos en parte) se integrará en el cromosoma hospedador. El experto conoce métodos adecuados de modificación genética del hospedador para permitir que el hospedador produzca dominios.

Residuos aminoacídicos carbamilados

Como se describió anteriormente, la carbamilación (también denominada "carbamoilación") se refiere a la transferencia de un grupo carbamilado (también denominado "grupo carbamilo"), es decir, un grupo NH₂-CO-, de una molécula que contiene carbamilo (por ejemplo, cianato) a un resto aceptor, tal como un aminoácido, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo fenólico, imidazol y grupos fosfato de residuos aminoacídicos, según el esquema general: HNCO + RXH = RXCONH₂.

Los grupos carbamilamino en proteínas generalmente resultan de la reacción del cianato con grupos amino en proteínas, en particular con el extremo amino de proteínas (también conocido como el extremo N, extremo NH₂, extremo aminoterminal o extremo amino) y/o con grupos amino en las cadenas laterales de residuos de lisina y/o arginina (según el esquema general: HNCO + RNH₂ = RNHCONH₂). Grupo amino, grupo amina o radical amino se refieren a un grupo -NH₂, que consiste en un átomo de nitrógeno unido por enlaces sencillos a átomos de hidrógeno, grupos alquilo, grupos arilo, o una combinación de ellos. Sin embargo, el mecanismo exacto para la carbamilación de proteínas en *Pichia* sigue siendo desconocido.

Normalmente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina, que incluyen dominios variables únicos de inmunoglobulina VH y VHH, engloban residuos consenso de lisina (K) y arginina (R) (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 09/068625, páginas 176-178), tales como, por ejemplo, K en las posiciones 43, 75 y 83, y R en la posición 19, 27, 38, 45, 66 y 71. Sin embargo, también pueden estar presentes residuos adicionales de lisina y arginina.

Cualquier referencia al grupo amino debe entenderse que también se refiere a más de un grupo, es decir, a grupos amino, a menos que se especifique lo contrario.

En el contexto de la presente solicitud, el término "variante relacionada con el producto" significa un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende al menos una modificación química que da como resultado un perfil de RP-HPLC alterado en comparación con el dominio variable único de inmunoglobulina sin la modificación química. En algunos casos, la variante relacionada con el producto se abrevia como "variante".

Métodos generales

El experto conoce bien los métodos generales de producción de dominios variables únicos de inmunoglobulina en células hospedadoras.

Por ejemplo, se ha descrito ampliamente la producción de Nanobodies en hospedadores procariotas tales como *E. coli* (véase, por ejemplo, Ghahroudi et al., FEBS Letters 414: 521-526, 1997; Muyldermans, 74: 277-302, 2001; Vranken et al., Biochemistry 41: 8570-8579, 2002). La producción de Nanobodies en hospedadores eucariotas inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito ampliamente en el documento de patente WO 94/25591. El contenido de estas solicitudes se menciona explícitamente en relación con técnicas y métodos generales de cultivo generales, incluidos medios y condiciones adecuados.

El experto también puede idear construcciones genéticas adecuadas para la expresión de dominios en células hospedadoras basándose un conocimiento general común. La presente divulgación también se refiere a condiciones específicas y construcciones genéticas descritas en la técnica, por ejemplo, los métodos generales de cultivo, plásmidos, promotores y secuencias conductoras descritas en el documento de patente WO 94/25591, Gasser et al. Biotechnol. Bioeng. 94: 535, 2006; Gasser et al. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6499, 2007; o Damasceno et al. Microbiol. Biotechnol. 74: 381, 2007.

En una fracción significativa de los dominios variables únicos de inmunoglobulina, en particular Nanobodies, producidos por células hospedadoras, se observa la presencia de residuos aminoacídicos carbamilados, en particular grupos carbamilamino, tales como grupos aminotérminos carbamilados y/o grupos amina carbamilados en la cadena lateral de residuos de lisina y arginina. La presencia de estos residuos aminoacídicos carbamilados podría tener un

impacto en la calidad y la homogeneidad del producto final de Nanobody. No obstante, una elevada calidad y homogeneidad del producto es un requisito previo para, por ejemplo, el uso terapéutico de estos productos.

5 La presente solicitud describe métodos para la fabricación de dominios variables únicos de inmunoglobulina en donde se mejora la calidad de los dominios variables únicos de inmunoglobulina (es decir, con un nivel reducido de residuos aminoacídicos carbamilados, en particular de grupos carbamilamino, o su ausencia). La calidad de los dominios variables únicos de inmunoglobulina mejora aplicando condiciones específicas en las que se evita la formación del (de los) residuo(s) aminoacídico(s) carbamilado(s) durante el crecimiento del hospedador, durante la expresión del dominio variable único de inmunoglobulina y/o después de la expresión (es decir, antes o después de la purificación del dominio variable único de inmunoglobulina). La presente invención proporciona métodos de eliminación de la variante carbamilada relacionada con el producto.

10 15 Cualquier referencia a condiciones que evitan la formación de residuo(s) aminoacídico(s) carbamilado(s), en particular del (de los) grupo(s) carbamilamina, se entiende igualmente que significa condiciones que eliminan o reducen la formación de la variante carbamilada relacionada con el producto, y viceversa.

20 La eliminación significa que la variante carbamilada relacionada con el producto está separada físicamente de la mezcla de dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden tanto las especies de dominio variable único de inmunoglobulina deseadas que no tienen grupos amino carbamilada, como la variante carbamilada relacionada con el producto. El significado correcto será evidente a partir del contexto.

Más particularmente, la presente solicitud describe un método de producción de un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende al menos las etapas de:

25 i) cultivar un hospedador o célula hospedadora (como se define en el presente documento) en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplicará (también denominada fase de producción de biomasa, incluyendo la fase de lote y la fase de lote alimentado, por ejemplo, fase de lote alimentado con glicerol),
 30 ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina (también denominado fase de inducción),
 35 iii) opcionalmente seguido de aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio,
 en donde se aplican condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos amino, en la etapa i), en la etapa ii), después de la etapa ii) y/o en o después de la etapa iii), en particular en la etapa ii).

En un aspecto, la solicitud describe las condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos amino, se aplican en la etapa i). Por consiguiente, dicho método comprende al menos las etapas de:

40 i) cultivar un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique y que eviten la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, por ejemplo, al menos incluyendo lo siguiente: adaptar las condiciones de cultivo mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: adaptar el pH del cultivo, adaptar el tiempo de cultivo, adaptar la temperatura de cultivo, adaptar la saturación de oxígeno, adaptar la composición de alimento de glicerol y/o la velocidad de alimentación de glicerol, y/u optimizar la composición del medio de cultivo, incluyendo, pero sin limitación, el uso de medio libre de cianato, o cualquier combinación de los mismos;
 45 ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina;
 50 iii) opcionalmente seguido de aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio.

55 En un aspecto, la solicitud describe condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, se aplican en la etapa ii). Por consiguiente, dicho método comprende al menos las etapas de:

56 i) cultivar un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique;
 60 ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina y que eviten la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, por ejemplo, al menos incluyendo lo siguiente: adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: adaptar el pH del cultivo, en particular el pH de inducción; adaptar el tiempo de cultivo, en particular el tiempo de inducción; adaptar la temperatura de cultivo, en particular la temperatura de inducción; adaptar la saturación de oxígeno, en particular durante la fase de inducción; adaptar la composición del alimento de glicerol, en particular durante la fase de inducción, y/o la velocidad de alimentación de glicerol; adaptar los parámetros de inducción que

incluyen, entre otros, la adaptación de la velocidad de alimentación de metanol y/o la composición del alimento de metanol para hospedadores que requieren un alimento de metanol; y/u optimizar la composición del medio de cultivo, en particular durante la fase de inducción, incluyendo, pero sin limitación, el uso de medio libre de cianato, o cualquier combinación de los mismos;

iii) opcionalmente seguido de aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio.

En un aspecto, la aplicación describe condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, se aplican después de la etapa ii). En un aspecto, la solicitud describe condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, se aplican antes de la etapa iii).

Por consiguiente, el método de producción de un dominio variable único de inmunoglobulina en un hospedador comprende al menos las etapas de:

- i) cultivar un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique;
- ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina;
- iii) mantener el dominio variable único de inmunoglobulina obtenido en la etapa ii) en condiciones que eviten la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, por ejemplo, en las siguientes condiciones: adaptar el pH, adaptar el tiempo de retención y/o almacenamiento, adaptar la temperatura, adaptar la saturación de oxígeno;
- iv) opcionalmente seguido de aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio.

La presente solicitud también describe la aplicación de las condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular uno o más grupos amino, en o después de la etapa iii).

Por consiguiente, el método de producción de un dominio variable único de inmunoglobulina en un hospedador comprende al menos las etapas de:

- i) cultivar un hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora se multiplique;
- ii) mantener dicho hospedador o célula hospedadora en condiciones que sean tales que dicho hospedador o célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina;
- iii) aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio y aplicar condiciones que eviten la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos amino, por ejemplo, adaptando las condiciones de purificación mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: disminución del pH, disminución de la temperatura, optimización del medio de purificación, incluyendo, pero sin limitación, evitar disolventes o codisolventes que contengan cianato, tales como urea y similares, disminuir los tiempos de retención y/o almacenamiento, o cualquier combinación de los mismos.

La presente solicitud también describe la combinación de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, la presente solicitud describe el cultivo y mantenimiento del hospedador en condiciones que eviten y/o reduzcan la formación de la variante relacionada con el producto que comprende al menos un residuo aminoacídico carbamilado, en combinación con el mantenimiento del dominio variable único de inmunoglobulina en condiciones que previenen y/o reducen la formación de la variante carbamilada relacionada con el producto o que conducen a la eliminación o reducción de la variante carbamilada relacionada con el producto. El experto puede prever fácilmente una combinación adicional adecuada basándose en la enseñanza de la presente solicitud. Preferiblemente, en cada etapa de la producción del dominio variable único de inmunoglobulina, se aplican condiciones que previenen y/o reducen la formación de la variante carbamilada relacionada con el producto.

En la presente invención, el hospedador puede eliminarse del medio de cultivo por medios rutinarios. Por ejemplo, el hospedador puede eliminarse mediante centrifugación o filtración. La disolución obtenida mediante la eliminación del hospedador del medio de cultivo también se denomina sobrenadante de cultivo o sobrenadante de cultivo clarificado.

Según la presente invención, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden purificarse mediante métodos estándar a partir de sobrenadante de cultivo. Los métodos estándar incluyen, pero sin limitación, métodos cromatográficos, que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos métodos se pueden realizar solos o en combinación con otros métodos de purificación, por ejemplo, precipitación o electroforesis en gel. El experto puede idear combinaciones adecuadas de métodos de purificación para dominios variables únicos de inmunoglobulina basándose en un conocimiento general común. Para ejemplos específicos, se hace referencia a la técnica citada en el presente documento. Se prevé que cualquiera de las condiciones anteriores que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, también se pueda aplicar en o entre cualquier etapa de estos métodos de purificación.

A continuación, se analizan con más detalle ejemplos particulares de condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos, en particular de uno o más grupos aminoacídicos, adecuados para los métodos según la presente invención. La aplicación de estas condiciones también se denominará "tratamiento" del dominio variable único de inmunoglobulina.

5 La carbamilación puede evitarse adaptando el pH. Si el tratamiento se realiza durante la fase de cultivo, en particular de inducción, en presencia del hospedador, se elegirá el pH para que sea adecuado para el hospedador. Despues de la eliminación del hospedador, el pH se puede elegir en un intervalo más amplio, por ejemplo, de pH 3 a 6. Ejemplos específicos de pH adecuado a los que se pueden realizar los diversos tratamientos para evitar la carbamilación durante la fase de cultivo, en particular de inducción, en presencia del hospedador, *Pichia pastoris*, son un pH de aproximadamente 6,45 o menos, un pH de aproximadamente 6,4 o menos, un pH de aproximadamente 6,3 o menos, un pH de aproximadamente 6,25 o menos, un pH de aproximadamente 6,2 o menos, un pH de aproximadamente 6,1 o menos, un pH de aproximadamente 6 o menos, un pH de aproximadamente 5,7 o menos, un pH de aproximadamente 5,6 o menos, un pH de aproximadamente 5,5 o menos, un pH de aproximadamente 5 o menos, en particular de aproximadamente 5, 5,45, 5,5, 5,64, 5,75, 6, 6,04, 6,05, 6,1, 6,2, 6,25, 6,4 o 6,45.

10

15

El experto puede determinar fácilmente el tiempo de tratamiento adecuado para evitar la carbamilación en cualquiera de las etapas del método descritas a continuación. Los efectos del tratamiento, es decir, la reducción de la variante carbamilada relacionada con el producto, pueden controlarse por los medios descritos en el presente documento, por ejemplo, RP-HPLC.

20 La temperatura del tratamiento dependerá de la etapa de aplicación del tratamiento. Si el tratamiento se realiza durante la fase de cultivo, en particular de inducción, del hospedador, la temperatura de tratamiento será la misma que la temperatura de cultivo y/o inducción para ese hospedador, o por debajo de la temperatura de cultivo y/o inducción. El experto conoce temperaturas de cultivo e inducción adecuadas para diferentes hospedadores. Si el tratamiento se realiza en presencia del hospedador, pero a una temperatura reducida, la temperatura puede ser, por ejemplo, de 1 a 15°C, tal como 5°C o 10°C, por debajo de la temperatura de cultivo y/o inducción normalmente empleada para el hospedador respectivo. Las temperaturas de tratamiento a modo de ejemplo que pueden aplicarse durante la fase de cultivo y/o inducción del hospedador, *Pichia pastoris*, son 20°C, 22°C, 23°C, 24,5°C, 25°C, 25,5°C, 26°C, 26,25°C, 30 26,75°C o 27,5°C. Despues de eliminar el hospedador, la temperatura puede disminuirse adicionalmente. Una temperatura de tratamiento preferible es la temperatura ambiente (20-25°C).

25 Despues de la eliminación del hospedador, el dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en una amplia gama de tampones adecuados. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o Tris-HCl. El dominio variable único de inmunoglobulina también puede estar presente en solución salina fisiológica. Preferiblemente, el dominio variable único de inmunoglobulina está presente en un tampón que no contiene urea o cianato.

30 Con posterioridad a uno cualquiera o cualquier combinación de tratamientos según la presente invención, el dominio variable único de inmunoglobulina puede transferirse a un nuevo sistema de tampón, si se desea. La transferencia puede realizarse por medios rutinarios. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede transferirse a PBS mediante diálisis. El dominio variable único de inmunoglobulina también puede transferirse a solución salina fisiológica. El experto puede elegir fácilmente otros sistemas de tampón adecuados.

35 40 Los tratamientos anteriores se pueden realizar en diferentes etapas del proceso de cultivo:

a) Adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción

45 En un aspecto adicional de la solicitud, que puede emplearse sola o en combinación con cualquier otro aspecto como se describe en el presente documento para reducir la formación de variantes relacionadas con el producto con residuos aminoacídicos carbamilados, en particular de grupos carbamilamino, pueden adaptarse las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción.

50 55 El experto conoce las condiciones de cultivo estándar, incluidas las condiciones de inducción, para hospedadores adecuados para la producción recombinante de dominios variables únicos de inmunoglobulina.

60 Como ejemplo específico, la levadura *P. pastoris* se cultiva normalmente como un cultivo de alta densidad celular (lote alimentado con glicerol) y la inducción se inicia mediante la adición de metanol. El protocolo estándar para la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia* es el protocolo de Invitrogen, expresión a 30°C en medio salino basal con una velocidad de alimentación de metanol de 10,9 ml/l/h. Otros métodos para el cultivo de *Pichia* serán conocidos por el experto y se describen, por ejemplo, en *Methods in Molecular Biology™*, *Pichia protocols*, segunda edición, Humana Press.

65 En comparación con las condiciones estándar, que incluyen, pero sin limitación, las exemplificadas para *P. pastoris*, se pueden aplicar una o más seleccionadas de las siguientes adaptaciones de las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, para reducir la formación de variantes carbamiladas relacionadas con el producto:

adaptar el pH de cultivo, preferentemente el pH de inducción; adaptar el tiempo de cultivo, preferentemente el tiempo de inducción; adaptar la temperatura de cultivo, preferiblemente la temperatura de inducción; adaptar la saturación de oxígeno, preferiblemente durante la fase de inducción; adaptar la composición de alimento de glicerol, en particular el porcentaje de sustrato complejo en el alimento de glicerol, preferiblemente durante la fase de inducción, y/o la tasa de alimentación de glicerol; adaptar los parámetros de inducción, que incluyen, pero sin limitación, la adaptación de la tasa de alimentación de metanol y/o la composición de alimentación de metanol para hospedadores que requieren un alimento de metanol; y/u optimización de la composición del medio de cultivo, en particular durante la fase de inducción, que incluye, pero sin limitación, el uso de medio libre de cianato, la adición de extracto de levadura y/o peptona, o cualquier combinación de los mismos.

La siguiente descripción detallada se dará en el contexto del protocolo estándar (el protocolo de Invitrogen) para el cultivo de *P. pastoris*, como se expone anteriormente. El experto estará fácilmente en condiciones de adaptar esta enseñanza a los protocolos estándar utilizados para otros hospedadores. Por ejemplo, cuando la temperatura estándar para el cultivo de *P. pastoris* es de 30°C, la temperatura de cultivo puede adaptarse, por ejemplo, a 25°C. Es evidente para el experto que, para otro hospedador, la temperatura de cultivo estándar que es de 37°C, 32°C o 30°C puede representar una adaptación similar de la temperatura de cultivo.

Una posible adaptación de las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, para reducir la formación de variantes carbamiladas relacionadas con el producto se refiere a un pH de cultivo y/o inducción adaptado, en particular una reducción del pH de cultivo y/o inducción en comparación con el pH de cultivo y/o inducción estándar para el organismo hospedador. Un ejemplo de un pH de cultivo y/o inducción adaptado, en particular un pH de cultivo y/o inducción reducido, para *Pichia pastoris*, es una adaptación a un pH de aproximadamente 6,45 o menos, a un pH de 6,4 o menos, a un pH de aproximadamente 6,3 o menos, a un pH de aproximadamente 6,25 o menos, a un pH de aproximadamente 6,2 o menos, a un pH de aproximadamente 6,1 o menos, a un pH de aproximadamente 6 o menos, a un pH de aproximadamente 5,7 o menos, a un pH de aproximadamente 5,6 o menos, a un pH de aproximadamente 5,5 o menos, a un pH de aproximadamente 5 o menos, en particular, a un pH de aproximadamente 5, 5,45, 5,5, 5,64, 5,75, 6, 6,04, 6,05, 6,1, 6,2, 6,25, 6,4 o 6,45.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes carbamiladas relacionadas con el producto, que se aplicará sola o junto con el pH de cultivo y/o inducción adaptado, o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es una adaptación del tiempo de cultivo, en particular el tiempo de lote (alimentado con glicerol) y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, en particular una reducción del tiempo de cultivo, en particular el tiempo de lote (alimentado con glicerol) y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, por ejemplo en un 30-80%, en comparación con el tiempo de cultivo estándar, el tiempo de lote (alimentado con glicerol) o el tiempo de inducción para el organismo hospedador. Dicha adaptación puede ser, por ejemplo, una reducción del 30%, 50%, 70% o 80% en comparación con el cultivo estándar, el tiempo de lote (alimentado con glicerol) o el tiempo de inducción para el organismo hospedador.

Un ejemplo de un tiempo de inducción adaptado, para *Pichia pastoris*, es una reducción del tiempo de inducción de aproximadamente 96 horas a un período entre 24 y 96 horas, en particular a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 56 horas, aproximadamente 64 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 80 horas, aproximadamente 88 horas o aproximadamente 96 horas. Un ejemplo de un tiempo de lote alimentado con glicerol adaptado, para *Pichia pastoris*, es una reducción del tiempo de lote alimentado con glicerol de aproximadamente 16 a 18 horas a un período de entre 2 a 4 horas.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes relacionadas con el producto, que se aplicará sola o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptados, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptados, y/o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es adaptar la temperatura de cultivo y/o inducción, en particular una reducción de la temperatura de cultivo y/o inducción, por ejemplo de 1 a 15°C, en comparación con la temperatura de cultivo y/o inducción estándar para el organismo hospedador. Por ejemplo, la temperatura de cultivo y/o inducción se puede bajar en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15°C. En un aspecto preferido, la temperatura de cultivo y/o inducción se baja en 5°C, por ejemplo, de 30°C a 25°C, o en 10°C, por ejemplo, de 30°C a 20°C. Un ejemplo de una temperatura de inducción adaptada, para *Pichia pastoris*, es una bajada de la temperatura de inducción de aproximadamente 30°C a aproximadamente 27,5°C, 27°C, 26,5°C, 26°C, 25,5°C, 25°C, 24,5°C, 24°C, 23°C, 22°C o 20°C.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes carbamiladas relacionadas con el producto, que se aplicará sola o junto con uno o más de los pH de cultivo y/o inducción adaptados, tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, temperatura de cultivo y/o inducción adaptada y/o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es una adaptación de la saturación de oxígeno (concentración de oxígeno disuelto) del medio de cultivo, preferiblemente durante la fase de inducción, en particular disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto, por ejemplo, de 0,3 a 0,8 veces, en comparación con la concentración de oxígeno disuelto estándar para el hospedador respectivo. Dicha disminución puede ser, por ejemplo, una disminución de la concentración de oxígeno disuelto hasta un intervalo entre el 5% y el 24%, por ejemplo, hasta

el 5%, hasta el 15% o hasta el 22,5%, en comparación con la concentración de oxígeno disuelto estándar del 30% para *Pichia pastoris*.

- 5 Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que se aplicará sola o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, saturación de oxígeno adaptada y/o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es una adaptación de la velocidad de alimentación y/o composición de glicerol. Dicha adaptación de la composición de alimentación de glicerol puede ser, por ejemplo, una disminución en el porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol en comparación con el porcentaje estándar de sustrato complejo en la alimentación de glicerol para el organismo hospedador, tal como una disminución de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 5%, o de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 15%, a aproximadamente un 10% o aproximadamente un 5%, para *Pichia pastoris*. Dicha adaptación de la tasa de alimentación de glicerol puede ser, por ejemplo, una disminución en la tasa de alimentación de glicerol de un 30% a un 80% en comparación con la tasa de alimentación de glicerol estándar para el hospedador respectivo.
- 10 15 Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que se aplicará sola o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, saturación de oxígeno adaptada, tasa de alimentación y/o composición de glicerol adaptada, y/o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es una adaptación de la tasa de alimentación y/o composición de metanol. Un ejemplo de una tasa de alimentación de metanol adaptada es una reducción o un aumento de un 30 a un 80%, tal como en un 30%, 50%, 70% u 80%, en comparación con el protocolo estándar. En un aspecto específico, la velocidad de alimentación de metanol se reduce a 9 ml/l*h o menos, a 8 ml/l*h o menos, a 7,5 ml/l*h o menos, a 7 ml/l*h o menos, a 6,5 ml/l*h o menos, a 6 ml/l*h o menos, a 5 ml/l*h o menos, a 4 ml/l*h o menos, a 3 ml/l*h o menos, a 2 ml/l*h o menos, en comparación con la tasa de alimentación de metanol estándar para *Pichia pastoris*.
- 20 25 Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que se aplicará sola o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, saturación de oxígeno adaptada, tasa de alimentación y/o composición de metanol adaptada, tasa de alimentación y/o composición de glicerol adaptada, y/o cualquier otro aspecto descrito en el presente documento, es una adaptación de la composición del medio, por ejemplo, usando un medio complejo en lugar de un medio salino basal y/o mediante la adición de sustratos complejos tales como extracto de levadura y/o peptona. Por ejemplo, se puede añadir extracto de levadura y/o peptona directamente en el medio de cultivo a una concentración de 0 a 5% y/o se puede añadir a la alimentación de glicerol y/o metanol en una concentración de 0 a 20% para una *Pichia pastoris*.
- 30 35 40 Para el proceso de producción global, la adición de sustratos complejos, tales como extracto de levadura y/o peptona, tiene la ventaja adicional de reducir fuertemente o evitar completamente la aparición de fragmentos de dominios variables únicos de inmunoglobulina. Esta variante estructural adicional probablemente está formada por actividad proteolítica. Sin querer estar ligado por teoría, la adición de extracto de levadura y/o peptona puede proporcionar sustratos alternativos para las proteasas, de modo que se reduzca o evite por completo la formación de dominios variables únicos de inmunoglobulina degradados.

45 El experto puede combinar fácilmente las medidas anteriores, tal como para idear condiciones de cultivo optimizadas. El nivel de variante carbamilada relacionada con el producto en las diferentes condiciones se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante RP-HPLC o cIEF.

b) Adaptar las condiciones de purificación

50

- Después de la separación del dominio variable único de inmunoglobulina del hospedador, el dominio variable único de inmunoglobulina puede tratarse de varias formas que disminuyen la formación de aminoácidos carbamilados.
- 55 El pH de la disolución de dominio variable único de inmunoglobulina puede disminuirse. Ejemplos de un pH disminuido son, por ejemplo, pH 6,4 o inferior, un pH en el intervalo de pH 5 a 6,4, más específicamente aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 6 o aproximadamente pH 6,4. Dicha disminución del pH también conducirá a la reducción de variantes carbamiladas relacionadas con el producto por sí solas, es decir, sin combinación con disminución de la temperatura.
- 60 Como alternativa a la disminución del pH y/o además de esta medida, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden someterse a una disminución de la temperatura. La disminución de la temperatura con aproximadamente 5 a 10°C dará como resultado una reducción de la variante carbamilada relacionada con el producto evitando la formación del aminoácido(s) carbamilado(s).
- 65 Las medidas anteriores de disminución del pH y/o disminución de la temperatura se pueden combinar además con evitar tampones y/o (co)disolventes que contienen cianato. Ejemplos de tampones y (co)disolventes libres de cianato

son, por ejemplo, tampones sin urea. El uso de tampones y (co)disolventes libres de cianato también conducirá a la reducción de variantes carbamiladas relacionadas con el producto por sí solas, es decir, sin combinación con disminución del pH y/o disminución de la temperatura.

5 Se puede apreciar que las combinaciones de una o más de las medidas de disminución de pH, disminución de la temperatura y tampones y/o (co)disolventes libres de cianato mejorarán el evitar aminoácido(s) carbamilado(s) en la variante carbamilada relacionada con el producto, de modo que la variante carbamilada se reduce más rápidamente y/o en mayor medida.

10 **c) Eliminación de variante carbamilada relacionada con el producto mediante cromatografía de intercambio iónico**

Las medidas descritas anteriormente, solas o en combinación, tienen como objetivo reducir la variante carbamilada relacionada con el producto evitando la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos.

15 Sin embargo, en un aspecto adicional, que puede usarse solo o en combinación con una o más de las medidas o tratamientos anteriores, la presente invención también se refiere a la eliminación de variante carbamilada relacionada con el producto. En este contexto, la eliminación significa la separación física del producto deseado, y es distinta de la conversión de la variante en el producto deseado evitando la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos.

20 El experto puede utilizar una serie de técnicas estándar para eliminar la variante carbamilada relacionada con el producto en virtud de cambios en la carga y la hidrofobia de la proteína en la variante en vista del (de los) grupo(s) carbamilado(s) añadido(s). Estos cambios pueden usarse, por ejemplo, para separar la variante carbamilada del producto basándose en un cambio concomitante en el punto isoeléctrico (pI) y la hidrofobia. Las técnicas cromatográficas estándar, que comprenden, pero sin limitación, cromatografía de intercambio iónico (IEX), por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución con intercambio iónico (IEX-HPLC), cromatografía de modo mixto, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y similares, preferiblemente cromatografía de intercambio iónico (IEX), se pueden utilizar para separar el producto carbamilado en función de la variante observado en función de la variante de la carbamilada.

30 La eliminación de la variante carbamilada relacionada con el producto por separación física del dominio variable único de inmunoglobulina deseado se puede realizar sola o en combinación con cualquiera de los otros aspectos como se describe en el presente documento. Ventajosamente, en el caso de una combinación, primero se realizarán uno o más métodos o tratamientos que reducen la cantidad de variante carbamilada relacionada con el producto evitando la carbamilación de residuo(s) aminoacídico(s), seguido de una etapa de eliminación de la variante carbamilada restante mediante separación física.

Dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por el método de la invención

40 La presente solicitud también describe el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por los métodos de la invención como se describe en el presente documento. Se caracteriza por un nivel reducido, o la ausencia completa, de la variante relacionada con el producto que comprende al menos un residuo aminoacídico carbamilado, que comprende en particular al menos un grupo carbamilamino. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por los métodos de la presente invención comprende 0-5%, más preferiblemente 0-4%, 0-3%, 0-2% o 0-1% de una variante carbamilada relacionada con el producto. Lo más preferiblemente, el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por el método de la presente invención estará libre de la variante carbamilada relacionada con el producto. El experto puede determinar fácilmente la proporción de variante carbamilada relacionada con el producto -como un % del total-, por ejemplo, mediante RP-HPLC, cIEF o LC-MS como se describe en el presente documento.

50 En otras palabras, el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por los métodos de la presente invención se caracteriza por una homogeneidad estructural mejorada en comparación con los preparados del estado de la técnica. En particular, los preparados del estado de la técnica pueden comprender 5-15%, o incluso mayores proporciones de variante carbamilada relacionada con el producto.

55 En vista de la homogeneidad estructural mejorada, el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible mediante el método de la presente invención es ventajoso en comparación con los preparados del estado de la técnica. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina de la presente invención es ventajoso para aplicaciones terapéuticas. En relación con el uso de anticuerpos terapéuticos, la homogeneidad estructural es de importancia clínica y reguladora primordial.

60 Por consiguiente, la presente solicitud también describe preparados farmacéuticos y otras composiciones que comprenden el dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por los métodos de la presente invención. La presente solicitud también describe el uso médico del dominio variable único de inmunoglobulina obtenible por el método de la presente invención.

El experto puede formular fácilmente formulaciones farmacéuticamente adecuadas basándose en el conocimiento general común. Además, se hace referencia explícita a las referencias que tratan específicamente de dominios variables únicos de inmunoglobulina, que se citan en el presente documento. Sin limitación, se pueden preparar formulaciones para vías de administración estándar, incluyendo formulaciones para administración nasal, oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravaginal, rectal, aplicación tópica o aplicación por inhalación.

Basándose en la presente invención, el experto también puede idear fácilmente métodos adecuados de tratamiento caracterizados por el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del dominio variable único de inmunoglobulina obtenible mediante el método de la presente invención.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: El análisis por RP-HPLC reveló sorprendentemente la presencia de variantes relacionadas con el producto en el material producido en *P. pastoris*

La producción de Nanobodies en hospedadores eucariotas inferiores, tales como *Pichia pastoris*, se ha descrito ampliamente en el documento de patente WO 94/25591 y se sabe que da como resultado un producto de buena calidad. Además, como se describe en la solicitud de patente WO2010/125187, el material producido en *P. pastoris* se caracteriza por una funcionalidad igual y una homogeneidad incluso mayor en comparación con el material producido por *E. coli*.

Por lo tanto, resultó muy sorprendente encontrar, en determinadas condiciones de fermentación, además del pico principal del producto, determinados picos posteriores en los cromatogramas de RP-HPLC del material producido por *P. pastoris*, lo que indica la presencia de variantes relacionadas con el producto.

Como se indica en la Tabla 1, se probaron varias condiciones de fermentación para la expresión de Nanobody A en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

30 Nanobody A (también denominado en lo sucesivo "NbA") se ha descrito previamente en la solicitud de patente WO2010/115998 y es un Nanobody bivalente biespecífico que consiste en dos dominios variables únicos de inmunoglobulina humanizada de un anticuerpo llama de cadena pesada, de los cuales una subunidad ha madurado por afinidad y es específico para unirse al antígeno A1 (denominado en lo sucesivo NbA1), mientras que la subunidad restante se une a seroalbúmina humana (denominada en lo sucesivo NbA2). Las subunidades se fusionan de cabeza 35 a cola con un conector de glicina serina de nueve aminoácidos (9GS) en el siguiente formato: NbA1 - 9GS - NbA2 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 1):

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGSVPKINVMWYRQAFGKGRELVAGIISCGSPTSYAD
SVNGRKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDIATVYVCAFITTESDYDLGRYYWQQGTLVTVSSG
GGGSQQGGSEVQLVDSGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKCLEWVSSISG
SSDSTLYADSVVKRGFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDIATVYVCTIQQGSLRSSSQGTLVIVSS
```

40 Normalmente se realizaron lotes alimentados con glicerol de *Pichia* en medio rico y la inducción se inició mediante la adición de metanol. Las condiciones de cultivo variaron en términos de pH, temperatura, tasa de alimentación de metanol, pO₂ (concentración de oxígeno disuelto) y composición del medio (Tabla 1).

45 Tabla 1. Descripción general de las diferentes condiciones de fermentación probadas para la expresión de Nanobody A en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y el % de área de los picos posteriores correspondientes a variantes relacionadas con Nanobody A con diferencia de masa de -18 Da y +43 Da (NbA-18 Da y NbA+43 Da) observada en cromatogramas de RP-HPLC obtenidos de muestras de caldo clarificadas tomadas durante la fase inicial de expresión (momento de tiempo 1, de 15 a 35 horas después del inicio de la inducción) y en la obtención (momento de tiempo 2, de 80 a 160 horas después del inicio de la inducción) durante la fermentación de Nanobody A (hai: horas después de la inducción; 50 WCW: peso húmedo de las células; *: % del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody A con diferencia de masa de dos veces +43 Da)

N.º	Condiciones de inducción	% de área del pico posterior correspondiente a NbA-18 Da y NbA+43 Da en el momento de tiempo:	
		1	2
015	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l	17,20 hai 7,3%	82,60 hai 15,3%
	pH = 7,0		
	Temperatura = 20°C		

ES 2 996 232 T3

N. ^º	Condiciones de inducción	% de área del pico posterior correspondiente a NbA -18 Da y NbA +43 Da en el momento de tiempo:	
		1	2
	Tasa de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 30%		
	+ alimentación de complejo durante la alimentación MeOH		
017	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l	17,20 hai 11,4%	82,60 hai 30,7% + 8,3%*
	pH = 7,0		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 10 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 15%		
	+ alimentación de complejo durante la alimentación MeOH		
023	Inducción en WCW de aproximadamente 460 g/l	32 hai 4,8%	144,50 hai 6,9%
	pH = 6,5		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 40%		
024	Inducción en WCW de aproximadamente 350 g/l	17,10 hai 6,9%	155 hai 5,4%
	pH = 6,5		
	Temperatura = 25°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 8 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 22,5%		
025	Inducción en WCW de aproximadamente 200 g/l	18,23 hai 4,3%	162,23 hai 8,5%
	pH = 6,5		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 5%		
030	Inducción en WCW de aproximadamente 450 g/l	24,50 hai 3,7%	98,20 hai 5,1%
	pH = 6,5		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 40%		
032	Inducción en WCW de aproximadamente 460 g/l	19 hai 3,4%	92,70 hai 4%
	pH = 6,0		
	Temperatura = 30°C		

N. ^º	Condiciones de inducción	% de área del pico posterior correspondiente a NbA -18 Da y NbA +43 Da en el momento de tiempo:	
		1	2
	Tasa de alimentación de MeOH = 4,7 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 30%		
027	Inducción en WCW de aproximadamente 440 g/l	32 hai 3,0%	144,50 hai 3,5%
	pH = 5,5		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 8 ml/h/l de volumen inicial		
	pO ₂ = 5%		
018	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l	17,20 hai 4,1%	82,60 hai 4,8%
	pH = 5,0		
	Temperatura = 30°C		
	Tasa de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial		
	+ alimentación de complejo durante la alimentación MeOH		
	pO ₂ = 30%		

El control durante el proceso (IPC) se realizó en muestras de caldo clarificadas que se tomaron en diferentes momentos de tiempo durante la fermentación para determinar la concentración de producto y evaluar la presencia de variantes relacionadas con el producto.

- 5 La primera etapa del protocolo IPC consiste en una etapa de preparación de muestra usando cromatografía de afinidad con proteína A. Esta etapa se requiere para purificar el Nanobody de componentes del medio para obtener una alta resolución durante la segunda etapa del protocolo, es decir, análisis de RP-HPLC.
- 10 Los experimentos de RP-HPLC se llevaron a cabo en una columna Zorbax 300SB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 um; Agilent, pieza n.^º 883995-906).
- 15 A continuación, se determinaron las cantidades relativas de producto y variantes relacionadas con el producto midiendo la absorbancia de la luz de los componentes que eluían de la columna de RP-HPLC. La cantidad relativa de una variante de proteína específica, expresada como el % de área, se calculó dividiendo el área del pico correspondiente a la variante por el área integrada total (área relevante).
- 20 Los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos de muestras de IPC tomadas en la fase inicial de expresión (momento de tiempo 1) y en la obtención (momento de tiempo 2) de Nanobody A mostraron un pico posterior con tiempo de retención relativo (RRT) de 1,06.
- 25 El producto correspondiente a este pico posterior mostró una diferencia de masa de -18 Da con Nanobody A (denominado en lo sucesivo "NbA -18 Da"), lo que indica que es una variante de piroglutamato de Nanobody A, cuya formación da como resultado pérdida de agua tras el ciclado del ácido glutámico aminoterminal de Nanobody A.
- 30 Los cromatogramas de RP-HPLC representativos de fermentaciones realizadas a pH 6 e inferior se muestran en la Figura 1: Esta figura muestra los cromatogramas obtenidos de muestras de IPC tomadas a 19 hai (Figura 1A) y 92,70 hai (Figura 1B) en la condición de fermentación número 032 en la Tabla 1 que indica el pico posterior correspondiente a NbA -18 Da.
- 35 Este pico posterior fue similar en todas las condiciones de fermentación probadas, lo que indica que la formación de esta variante no se correlacionó con las condiciones probadas (Tabla 1).
- Sorprendentemente, en todas las fermentaciones realizadas a pH 6,5 y superior, se observó un pico posterior adicional con RRT de 1,04.

Este pico posterior se superpone en gran medida con el pico posterior NbA -18 Da y se encontró que tenía una diferencia de masa de +43 Da con Nanobody A (denominado en lo sucesivo "NbA +43 Da"), lo que indica la posibilidad de carbamilación de Nanobody A.

5 Además, en una configuración de fermentación particular (número 017 en la Tabla 1), estaba presente un pico posterior adicional con RRT de 1,07 en la muestra al final de la fermentación.

10 El pico posterior adicional se identificó por espectrometría de masas como Nanobody A con dos masas adicionales de +43 Da (denominado en lo sucesivo "NbA + 2×43 Da"), lo que indica la posibilidad de una variante relacionada con Nanobody A que está carbamilada en dos sitios diferentes.

15 La Figura 2 muestra cromatogramas obtenidos de muestras de IPC tomadas a 17,20 hai (Figura 2A) y 82,60 hai (Figura 2B) en la condición de fermentación número 017 en la Tabla 1 que indican los picos posteriores superpuestos con RRT de 1,06 y 1,04 correspondientes a NbA -18 Da y NbA +43 Da, respectivamente, y el pico posterior con RRT de 1,07 correspondiente a NbA + 2×43 Da.

20 Se observó que el pico posterior de NbA +43 Da ya estaba presente en las fases iniciales de expresión y que este pico posterior aumentó en función del tiempo de inducción en prácticamente todas las condiciones de fermentación probadas (Tabla 1 y Figura 2). Sin embargo, este aumento observado dependiente del tiempo del pico posterior NbA +43 Da fue más pronunciado a niveles de pH más altos (Tabla 1).

Ejemplo 2: Identificación del sitio de carbamilación en Nanobody A

25 La carbamilación es generalmente el resultado del ácido isociánico que reacciona notablemente con el extremo amino de las proteínas, pero también ataca las cadenas laterales de los residuos de lisina y arginina.

30 Para comprobar la posibilidad de carbamilación e identificar el (los) sitio(s) de carbamilación en Nanobody A, se analizó la muestra de IPC del fermentador 017 a 82,6 hai (muestra obtenida purificada usando cromatografía con proteína A) mediante cartografía peptídica. Esta muestra se denominó Nanobody A-017CV. Esta muestra también se usó en experimentos descritos en las siguientes secciones.

35 Se realizó una digestión tríptica en Nanobody A-017CV y la muestra digerida se analizó mediante RP-HPLC en una columna Zorbax 300SB-C18 (25 × 2,1 mm).

40 Los datos de espectrometría de masas (MS) se procesaron usando el software BiopharmaLynx™ (Waters). Se ubicó una masa adicional de +43 Da en el péptido aminoterminal (péptido T1). Aunque las mediciones de masa total indicaron la aparición de carbamilación en dos sitios diferentes, no se pudieron identificar péptidos adicionales con una masa de +43 Da con el método usado.

45 Para determinar el sitio de carbamilación exacto, se realizó espectrometría de masas en tandem con cromatografía de líquidos (LC/MSMS) en el péptido T1 +43 Da usando dos métodos de fragmentación diferentes, es decir, con energía de colisión baja o alta. Usando este último método, se demostró claramente en la serie de iones b que +43 Da estaba ubicado en el residuo de ácido glutámico (E) aminoterminal. Este resultado mostró que la reacción de carbamilación se produjo predominantemente en el extremo amino de Nanobody A.

Ejemplo 3: Efecto de la carbamilación sobre la unión de Nanobody A a HSA y diana A

50 Nanobody A se une tanto a la diana A como a la seroalbúmina humana (HSA). Estas dos funcionalidades pueden probarse mediante:

- 1) un método de Biacore para la unión a la diana A o HSA que permite una selección rápida de la funcionalidad de unión de Nanobody A a sus dianas respectivas. Las comparaciones de las pendientes de la unión se usan para la comparación relativa.
- 2) dos ensayos de potencia basados en enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) diferentes para monitorizar las potencias relativas para la diana A y HSA.

55 La muestra carbamilada Nanobody A-017CV se analizó usando Biacore y los ensayos de potencia para verificar si la carbamilación podría afectar a la potencia. Esta muestra se carbamiló para un 30,7% en el extremo amino y para un 8,3% carbamilado en un sitio adicional, muy probablemente un residuo de lisina o arginina. Esta muestra también contenía 10% de fragmentos de degradación proteolítica, por lo que se podía esperar una potencia máxima del 90-100%.

Experimentos de Biacore para la unión de Nanobody A carbamilado a HSA y a la diana A:

60 Los experimentos de Biacore se realizaron en un instrumento Biacore3000 (GE Healthcare). Se observó una actividad del 77,6% para la unión a la diana A de Nanobody A-017CV carbamilado en comparación con el Nanobody A de

referencia (Tabla 2). Esta pérdida aparente de actividad también se observó durante el análisis de Biacore en HSA inmovilizada (Tabla 3), donde se demostró una actividad restante del 78,1%.

5 Tabla 2. Resultados de Biacore que muestran el % de unión de Nanobody A carbamilado en la diana A con respecto al material de referencia no carbamilado.

Nanobody A	Pendiente (UR/s)	Funcionalidad en comparación con Ref (%)
Referencia	0,581	
NbA-017CV 5 nM	0,451	77,6

10 Tabla 3. Resultados de Biacore que muestran el % de unión de Nanobody A carbamilado en HSA con respecto al material de referencia no carbamilado.

Nanobody A	Pendiente promedio (UR/s)	Funcionalidad en comparación con Ref (%)
Referencia	3,99	
NbA-017CV 5 nM	3,1	78,1 (78,07-78,13)

15 Como no se espera que la carbamilación en el residuo aminoterminal tenga un impacto sobre las funcionalidades de unión de Nanobody A a la diana A y HSA, la pérdida de actividad se atribuyó muy probablemente a la carbamilación de un residuo de lisina o arginina en la secuencia de Nanobody A.

15 Ensayos basados en ELISA para determinar la potencia de Nanobody A carbamilado con respecto a un lote de referencia

20 El ensayo ELISA de potencia para la unión diana A fue un ensayo de tipo neutralización: Nanobody A inhibe la interacción entre el ligando de la diana A y la diana A (un receptor), previniendo así la señalización del receptor. Brevemente, se preincubó una mezcla de ligando de la diana A y Nanobody A, se complementó con diana A y posteriormente se capturó en los pocillos de una placa de múltiples pocillos recubierta con un Nanobody diferente que se une a la misma diana A que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 2):

EVQLVESGGGVQACGSLRLSCLASGDNFSINRMGWYRCALGKORELVALITNNKGSTNYADAVKGRTF
ISRDYAKNTVYLQMNGLKPPDTAVYYCNAVISEVGTWRDDYWGQGCIQVTVSE

25 Se detectó un ligando de la diana A residual unido con anticuerpo monoclonal biotinilado anti-ligando A humano, estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) y una detección colorimétrica a 450 nm, respectivamente.

30 El ELISA desarrollado para la unión a HSA se basó en la unión directa de Nanobody A a HSA recubierta en la placa. Cualquier Nanobody A unido se detectó usando un anti-Nanobody-Nanobody acoplado directamente a HRP (peroxidasa de rábano picante) y una detección colorimétrica, respectivamente.

35 Las potencias medidas en ambos ensayos de ELISA se expresaron como potencias relativas en comparación con un material de referencia.

40 La caída aparente en la potencia observada usando el análisis de Biacore se confirmó mediante el análisis de muestra en los ensayos de potencia basados en ELISA (Tabla 4), donde se encontró una potencia relativa del 65,7% y el 72,4% para la unión a la diana A y a HSA, respectivamente.

40 Tabla 4. Resultados de potencia para la unión A a la diana A y a HSA de Nanobody A carbamilado. Las potencias se expresan con respecto a un lote de control no carbamilado.

	Diana A	
	Lote de control : Nanobody A-017CV	
Paralelismo (límites equiv)	APRUEBA	APRUEBA
Valores atípicos	0	0
Potencia relativa	1,020	0,657
Límite inferior del IC	0,963	0,619
Límite superior del IC	1,076	0,694
% de IC	11,0%	11,4%

	Diana A	
	Lote de control	Nanobody A-017CV
	HSA	
	Lote de control	Nanobody A-017CV
Paralelismo (prueba F)	APRUEBA	APRUEBA
Valores atípicos	0	0
Potencia relativa	1,052	0,724
Límite inferior del IC	0,956	0,660
Límite superior del IC	1,148	0,788
% de IC	18,2 %	17,6%

Ejemplo 4: La variante carbamilada puede eliminarse mediante cromatografía de intercambio iónico

Curiosamente, el análisis por isoelectroenfoque capilar (cIEF) de la muestra de Nanobody A-017CV, que contiene Nanobody A carbamilado una y dos veces, dio como resultado dos picos previos adicionales en el electroferograma en comparación con la muestra de referencia no carbamilada (Figura 3). El % de superficie total de estos picos ($\pm 40\%$) corresponde muy bien con el % de área de los picos posteriores observados durante RP-HPLC ($30,7\% + 8,3\% = 39\%$). Por lo tanto, estos picos representan muy probablemente las variantes carbamiladas, que aparentemente tienen un pl que es significativamente menor que el del producto no carbamilado (pl 9,7).

El cIEF se realizó usando un analizador iCE 280 Fast IEF (Convergent Biosciences) con un cartucho recubierto con FC (Cat n.º 101701). Las muestras se enfocaron durante 10 minutos a 3000 V en presencia de metilcelulosa al 1% y Pharmalytes al 2%, intervalo de pH 8-10,5.

La diferencia significativa de pl entre Nanobody A carbamilado y no carbamilado implica que la(s) variante(s) carbamilada(s) pueden eliminarse del material intacto usando cromatografía de intercambio iónico.

Los datos de apoyo para esta hipótesis se muestran en la Figura 4. Esta figura muestra los cromatogramas de RP-HPLC de un lote de Nanobody A antes de (A) y después (B) procesamiento aguas abajo con el protocolo de purificación de Nanobody A que consiste en 3 etapas cromatográficas, siendo la tercera etapa la cromatografía de intercambio catiónico.

El análisis de RP-HPLC de la muestra antes de la purificación, que se tomó en el momento de la obtención del fermentador y que se purificó parcialmente usando cromatografía con proteína A, mostró la presencia de un gran pico posterior. El análisis por cromatografía de líquidos acoplada al espectrómetro de masas (LC-MS) confirmó que los productos correspondientes a este pico posterior mostraron una diferencia de masa de -18 Da y +43 Da con Nanobody A, que indica que eran el piroglutamato y la variante carbamilada de Nanobody A descrita anteriormente (Figura 5A) y que este pico posterior correspondía al pico posterior con RRT de 1,04 que se superponía con el pico posterior RRT de 1,06 como se describió anteriormente.

Es importante destacar que el Nanobody A carbamilado ya no podía ser detectado por MS en el lote purificado final (Figura 5B), lo que indica que la variante carbamilada se eliminó durante el procesamiento aguas abajo. Esto concuerda con los datos de RP-HPLC del lote purificado (Figura 4B), en los que el % de área superficial del pico posterior ha disminuido claramente en comparación con el % de área superficial del pico posterior del lote después de la obtención.

La Figura 6 muestra los cromatogramas de RP-HPLC de muestras de Nanobody A que se tomaron antes y después de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico (RP-HPLC realizada según el método descrito en el Ejemplo 1). El % de área superficial del pico posterior 1 y 2 (respectivamente correspondiente a NbA -18 Da y NbA + 43 Da (pico posterior 1) y NbA + 2×43 Da (pico posterior 2) como se describe anteriormente) ha disminuido claramente después de esta etapa en comparación con la etapa del proceso anterior. El hecho de que la variante carbamilada pueda separarse del material intacto usando cromatografía de intercambio iónico concuerda con las diferencias de pl observadas entre Nanobody A intacto y carbamilado (Figura 3).

Ejemplo 5: La carbamilación *in vitro* (carbamilação forzada) de Nanobody A ocurre predominantemente en el aminoácido aminoterinal

La carbamilación puede inducirse *in vitro* incubando la proteína en urea. La urea en disolución está en equilibrio con cianato de amonio. La forma que reacciona con los grupos amino de la proteína es el ácido isociánico. La reacción de carbamilación puede acelerarse en disoluciones de urea descompuestas (por ejemplo, después del calentamiento; Stark et al., 1960, J. Biol. Chem. 235, 3177-3181).

Nanobody A se incubó durante 3 días a 25°C en disoluciones de urea 0 M, 1 M, 4 M u 8 M y se analizó con RP-HPLC.

En todas las muestras tratadas con urea, el análisis de RP-HPLC mostró la formación de un pico posterior que se superponía con el pico de piroglutamato (Figura 7). El % de área de este pico aumentó al aumentar la concentración de urea. Se observó un pico posterior adicional en el perfil de RP-HPLC de las muestras tratadas con urea 4 M y 8 M. El tiempo de retención de ambos picos posteriores se superpone con el de los picos observados en la muestra de IPC Nanobody A-017CV (véase la Figura 2) que se identificaron como variantes carbamiladas (reacción de carbamilación *in vivo*).

Se realizaron análisis de LC-MS y cartografía peptídica en la muestra tratada con la disolución de urea 1 M y se confirmó la aparición de carbamilación. La cartografía peptídica demostró que aproximadamente el 13% del péptido T1 aminoterminal contenía la masa adicional de +43 Da.

En conclusión, la carbamilación tanto *in vivo* como *in vitro* se produce predominantemente en el aminoácido aminoterminal.

En los siguientes ejemplos se demuestra que, tras la expresión de otros Nanobodies en *Pichia pastoris*, también se observó una variante relacionada con el producto de estos Nanobodies que comprende al menos un aminoácido carbamilado.

Ejemplo 5: Observaciones de una variante similar en Nanobody B expresadas en *Pichia pastoris*

Nanobody B (también denominado en lo sucesivo "NbB") se ha descrito previamente en el documento de patente WO 2011/161266 (solicitud no publicada PCT/EP2011/060738 que reivindica la prioridad de US 61/358.495) y es un Nanobody biparatópico que consiste en dos dominios variables únicos de inmunoglobulina optimizados en secuencia de un anticuerpo llama de cadena pesada, de los cuales una subunidad es específica para unirse a un primer epítopo en el antígeno B (denominado en lo sucesivo NbB1) y la otra subunidad para unirse a un segundo epítopo en el antígeno B (denominada en lo sucesivo NbB2). Las subunidades se fusionan de cabeza a cola con un conector de glicina serina de veinte aminoácidos (20GS) en el siguiente formato: NbB1 - 20GS - NbB2 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 3):

```
EVQLVESGGGLVQPGGELRISCAASGFTFSSYAMSWVPQAPGKGLEWWSGILKSSGDSTRYACSVVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAKSRSVSRGTYDNRGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGGGGGG  
SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFNNTAMGWFRQAPKEREVAAITRSGVRSGVSA  
IYGDSVKDRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIQSGALRRFEYDYSQQGTIVTVSS
```

Como se indica en la Tabla 5, se probaron varias condiciones de inducción para la expresión de Nanobody B en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

Normalmente se realizaron lotes alimentados con glicerol de *Pichia* en medio rico. Los parámetros durante la fase de producción de biomasa fueron idénticos para todas las condiciones de fermentación (pH 5, 30°C, 30% de oxígeno disuelto). La fase de inducción se inició cuando el peso húmedo de las células alcanzó 400±20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol. Se usaron diferentes tasas de alimentación de metanol (Tabla 5). Al inicio de la inducción, también se cambiaron los otros parámetros de inducción (pH y temperatura) (Tabla 5). La temperatura se cambió en una etapa y el pH se fijó en su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de ajuste (aumento de 1 unidad de pH por hora).

Tabla 5: Descripción general de las diferentes condiciones de inducción (en términos de pH, temperatura (t°) y tasa de alimentación de metanol (MeOH) durante la inducción) probadas para la expresión de Nanobody B en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y el % de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody B con diferencia de masa de +43 Da (NbB +43 Da) observada en cromatogramas de RP-HPLC

N.º	pH	t° (°C)	Tasa de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% área? del pico posterior correspondiente a NbB +43 Da
5	5	22	4	0
9	5	22	4	0
6	5	30	11	0
2	5,45	22	11	0
7	5,45	30	4	0
8	5,75	26	7,5	0
1	6,04	22	4	0

N. ^o	pH	t° (°C)	Tasa de alimentación de MeOH (ml/h/l)	área? del pico posterior correspondiente a NbB +43 Da
10	6,05	30	11	0
3	6,5	22	11	2,0
4	6,5	30	4	2,3

Para evaluar la calidad del Nanobody B producido en diferentes condiciones, cada sobrenadante libre de células se purificó parcialmente mediante una pequeña etapa de limpieza por intercambio catiónico (CEX) y se analizó mediante RP-HPLC.

5 Los experimentos de RP-HPLC se llevaron a cabo en una columna Zorbax 300SB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 µm; Agilent, pieza n.^o 883995-906).

10 La Figura 8 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos de muestras de cultivo libres de células purificadas en CEX tomadas 96 horas después de la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody B a pH 6,5 (línea discontinua; condición 4 en la Tabla 5) y pH 5 (línea sólida; condición 6 en la Tabla 5).

15 Correspondiente a las observaciones para Nanobody A, la fermentación realizada a pH 6,5 condujo a un aumento del pico posterior con un tiempo de retención relativo (RRT) de 1,05 (Figura 6).

15 Un análisis de LC-MS realizado en estas muestras indicó la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.

20 Para obtener una confirmación adicional de la identidad de las especies que se forman durante la fermentación a un pH más alto, se realizó un experimento de carbamilación forzada con Nanobody B purificado. Brevemente, Nanobody B se incubó en una disolución con urea 1 M (D-PBS, pH 7,4) durante 3 días a temperatura ambiente. Se sabe que este tratamiento induce la formación de aductos carbamilados. A continuación, la muestra se analizó mediante RP-HPLC y espectrometría de masas (véase la Figura 9).

25 El perfil cromatográfico de la muestra de Nanobody B tratada con urea muestra la formación de dos picos posteriores adicionales, teniendo el primero un tiempo de retención comparable al pico posterior observado en muestras fermentadas a pH 6,5 (Figura 8). El análisis de MS de estos picos posteriores confirmó la presencia de formas monocarbamiladas de Nanobody B.

30 La producción de formas carbamiladas aumentó llevando a cabo la fermentación a un pH más alto (6,5); a un pH más bajo (véase la Tabla 5) no se detectaron derivados carbamilados.

Ejemplo 7: Observaciones de una variante similar en Nanobody C expresada en *Pichia pastoris*

35 Nanobody C (también denominado en lo sucesivo "NbC") se ha descrito previamente en la solicitud de patente WO/2010/139808 y es un Nanobody trivalente que consiste en tres dominios variables únicos de inmunoglobulina de un anticuerpo de llama de cadena pesada, de los cuales las tres subunidades son específicas para unirse al mismo epítopo en el antígeno C (denominado en lo sucesivo NbC1). Las subunidades se fusionan de cabeza a cola con un conector de glicina serina de quince aminoácidos (15GS) en el siguiente formato: NbC1^{E1D}-15GS-NbC1-15GS-NbC1 (es decir, las tres subunidades tienen la misma secuencia aparte del ácido glutámico (E) aminoterminal en la primera subunidad que se ha cambiado en un ácido aspártico (D) para reducir la formación de piroglutamato en el extremo amino) y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 4):

```
DVQLVESGGGLVQAGGSLSISSCAASGGSLSNYVLGWFPRQAPGKEREVAAINWRGDTITIGPPNVEGRFTI
TISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGACTPLNPGAYIYDWSYDYWGRCGTQVTVS9GGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVSGGGLVQAGGSLSISSCAASGGSLSNYVLGWFPRQAPGKEREVAAINWRGDTITIGPPN
VEGRFTI
TISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGACTPLNPGAYIYDWSYDYWGRCGTQVTVSSGGGGS
GGGGSGGGCSEVQLVSGGGLVQAGGSLSISSCAASGGSLSNYVLGWFPRQAPGKEREVAAINWRGDT
IGPPNVEGRFTI
TISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGACTPLNPGAYIYDWSYDYWGRCGTQVTVSS
```

45 Como se indica en la Tabla 6, se probaron varias condiciones de fermentación para determinar la expresión de Nanobody C en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

50 Normalmente se realizaron lotes alimentados con glicerol de *Pichia* en medio complejo. Los parámetros durante la fase de producción de biomasa fueron idénticos para todas las condiciones de fermentación (pH 5, 30°C, 30% de oxígeno disuelto). La fase de inducción se inició cuando el peso húmedo de las células alcanzó 400±20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol. Se usaron diferentes tasas de alimentación de MeOH (Tabla 6). Al

inicio de la inducción, también se cambiaron los otros parámetros de inducción (pH, temperatura y composición del medio, más específicamente el porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol) (Tabla 6). La temperatura se cambió en una etapa y el pH se fijó en su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de ajuste (aumento de 1 unidad de pH por hora).

5 Tabla 6: Descripción general de las diferentes condiciones de inducción (en términos de pH, temperatura (t°), tasa de alimentación de metanol (MeOH) y composición del medio (porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol durante la inducción)) probado para la expresión de Nanobody C en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y áreas del
10 pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody C con diferencia de masa de +43 Da (NbC -43 Da) observada en cromatogramas RP-HPLC

N. ^o	pH	t° ($^{\circ}$ C)	Tasa de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de sustrato complejo en la alimentación de glicerol	% de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody C con diferencia de masa de +43 Da		
					en 96 hai	en 120 hai	en 140 hai
008	5,0	20	11	20	0,0	0,0	-
020	5,0	20	11	5	0,0	0,0	-
006	5,0	20	4	12	0,0	0,0	-
018	5,0	25,5	4	5	0,0	0,0	-
007	5,0	30	11	12	0,0	0,0	-
016	5,0	30	4	20	0,0	0,0	-
002	5,0	30	11	5	0,0	0,0	-
013	5,64	24,5	9	15	0,0	0,0	-
003	6,0	23	6,5	5	0,0	0,0	-
021	6,0	30	4	10	-	3,4	3,4
014	6,1	20	4	20	0,0	0,0	-
001	6,1	30	11	20	0,0	0,0	-
022	6,2	30	4	10	-	3,2	3,1
023	6,4	30	4	10	-	3,5	3,3
005	6,45	30	4	9	0,0	0,0	-
009	6,45	30	4	9	0,0	0,0	-
024	6,6	30	4	10	-	3,9	4,0
010	7,0	20	11	5	0,0	0,0	-
017	7,0	20	11	20	5,7	7,4	-
012	7,0	20	4	5	6,8	7,3	-
015	7,0	20	4	5	7,8	7,2	-
004	7,0	24,5	4	20	6,9	7,8	-
011	7,0	30	11	5	29,6	27,9	-
019	7,0	30	7	20	13,3	14,9	-

15 Para evaluar la calidad del Nanobody C producido en diferentes condiciones, cada sobrenadante libre de células se purificó parcialmente mediante una pequeña etapa de limpieza usando cromatografía de modo mixto y se analizó mediante RP-HPLC.

Los experimentos de RP-HPLC se llevaron a cabo en una columna Zorbax 300SB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 μ m; Agilent, pieza n.^o 883995-906).

20 La Figura 10 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos de muestras de cultivo libres de células purificadas mediante cromatografía de modo mixto tomada 118 horas después de la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody C a pH 7 (línea discontinua) y pH 6,4 (línea sólida).

25 Correspondiente a las observaciones para Nanobody A y Nanobody B, un pH de inducción más alto condujo a un aumento del pico posterior con un tiempo de retención relativo (RRT) de 1,04 (compárense, por ejemplo, las

condiciones de fermentación número 008 y 017 en la Tabla 6; Figura 10). Un análisis de LC-MS realizado en estas muestras demostró la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.

Además, se observó que el pico posterior de NbC +43 Da aumentó con el aumento de la temperatura de inducción (compárense, por ejemplo, las condiciones de fermentación número 010 y 011 en la Tabla 6) y/o el aumento del porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol (compárense, por ejemplo, las condiciones de fermentación número 010 y 017 en la Tabla 6).

Para obtener una confirmación adicional de la identidad de las especies que se forman durante la fermentación a un pH más alto, se realizó un experimento de carbamilación forzada con Nanobody C purificado. Brevemente, Nanobody C se incubó en una disolución con urea 4 M (durante 3 días a temperatura ambiente). Se sabe que este tratamiento induce la formación de aductos carbamilados. A continuación, la muestra se analizó mediante LC-MS (véase la Figura 11).

El perfil cromatográfico de la muestra de Nanobody C tratada con urea es comparable (a partir del RRT de los picos posteriores) al mostrado en la Figura 10 con respecto a una muestra de fermentación a pH 7,0; el análisis de MS en el pico posterior confirmó la presencia de formas monocarbamiladas y bicarbamiladas de Nanobody C.

La producción de formas carbamiladas de Nanobody C aumenta llevando a cabo la fermentación a un pH más alto (7,0); a un pH más bajo, tal como 6,4, los derivados carbamilados son apenas detectables.

Ejemplo 8: Observaciones de una variante similar en Nanobody D expresada en *Pichia pastoris*

Nanobody D (también denominado en lo sucesivo "NbD") se ha descrito previamente en la solicitud de patente WO2011/073180 y es un Nanobody trivalente que consiste en tres dominios variables únicos de inmunoglobulina de un anticuerpo de llama de cadena pesada, de los cuales las dos subunidades son específicas para unirse al mismo epítopo en el antígeno D (denominado en lo sucesivo NbD1), mientras que la subunidad restante se une a seroalbúmina humana (denominada en lo sucesivo NbD2). Las subunidades se fusionan de cabeza a cola con un conector de glicina serina de nueve aminoácidos (9GS) en el siguiente formato: NbD1 - 9GS - NbD2 - 9GS - NbD1 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 5):

```
DVQLVESGGILVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGRYKHNRECEPREFLVATITGGSSINYGDSVKGRFT
ISIDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSDTWTGQGTIVTVSSGGGGCGGGSEVQLVRSQQG
LVQFGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQARGKCLEWVSSIEGSGSDVLYADSVVKGRFTISRDNAKTT
LYLQMNSLRLPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTIVTVSSGGGGCGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
AASKSIGRLDRMGWYRHPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIENSKNTVYLQMNSLRPEDT
AVYYCNFNKYVTSDTWTGQGTIVTVSS
```

Como se indica en la Tabla 7, se probaron varias condiciones de fermentación para determinar la expresión de Nanobody D en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

Normalmente se realizaron lotes alimentados con glicerol de *Pichia* en medio rico. Los parámetros durante la fase de producción de biomasa fueron idénticos para todas las condiciones de fermentación (pH 5, 30°C, 30% de oxígeno disuelto). La fase de inducción se inició cuando el peso húmedo de las células alcanzó 400±20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol. Se usaron diferentes tasas de alimentación de MeOH (Tabla 7). Al inicio de la inducción, también se cambiaron los otros parámetros de inducción (pH y temperatura) (Tabla 7). La temperatura se cambió en una etapa y el pH se fijó en su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de ajuste (aumento de 1 unidad de pH por hora).

Tabla 7: Descripción general de las diferentes condiciones de inducción (en términos de pH, temperatura (t°) y tasa de alimentación de MeOH durante la inducción; probadas para la expresión de Nanobody D en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y el % de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody D con diferencia de masa de +43 Da (NbD +43 Da) observada en chromatogramas de RP-HPLC

N.º	pH de inducción	t° de inducción (°C)	Tasa de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody D con diferencia de masa de +43 Da
2	5,5	25	4	4,78
8	5,5	25	6	4,98
11	5,5	26,75	2	5,23
7	5,5	30	2	5,07

N. ^o	pH de inducción	t ^o de inducción (°C)	Tasa de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody D con diferencia de masa de +43 Da
12	5,5	30	6	4,74
9	6,25	25	2	6,94
3	6,25	27,5	6	7,2
13	6,25	30	4	10,6
5	7	25	2	11,4
1	7	25	6	20,25
10	7	27,5	4	28,48
4	7	30	2	16,85
6	7	30	6	32,24

Para evaluar la calidad del Nanobody D producido en diferentes condiciones, cada sobrenadante libre de células se purificó parcialmente mediante una pequeña etapa de limpieza en proteína A y se analizó mediante RP-HPLC.

- 5 Los experimentos de RP-HPLC se llevaron a cabo en una columna Acclaim 300 C18 (4,6 × 150 mm, 3 µm; Dionex, pieza n.^o 060266).
- 10 La Figura 12 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos de muestras de cultivo libres de células purificadas en proteína A tomadas 96 horas después de la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody D a pH 7 (condición 6) y pH 6,25 (condición 9).
- 15 Correspondiente a las observaciones para Nanobody A, B y C, un pH de inducción más alto condujo a un aumento del pico posterior con un tiempo de retención relativo (RRT) de 1,03 (compárense, por ejemplo, las condiciones de fermentación número 5 y 12 o 7 y 4 en la Tabla 7; Figura 11). Un análisis de LC-MS realizado en estas muestras demostró la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.
- Además, se observó que pico posterior de NbD +43 Da aumentó al aumentar la temperatura de inducción (compárense, por ejemplo, las condiciones de fermentación número 1 y 6 en la Tabla 7).
- 20 A menos que se indique de otro modo, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera en sí conocida, como será evidente para el experto. Por ejemplo, se hace referencia de nuevo a los manuales convencionales y a los antecedentes de la técnica generales mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en ellos; así como a, por ejemplo, las siguientes reseñas Presta, (Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., J. Immunol. Methods, 2001, 246(1-2), 31-45; Schmitz et al., Placenta, 2000, 21 Supl. A, S106-12, Gonzales et al., Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para la manipulación de proteínas, tales como la maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un dominio variable único de inmunoglobulina en *Pichia pastoris* que comprende
 - a) aplicar condiciones que reduzcan la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos en el dominio variable único de inmunoglobulina, seleccionados de:
 - bajar el pH al menos en la etapa de inducir al hospedador a producir el dominio variable único de inmunoglobulina a un pH de 6,45 o menos;
 - bajar la temperatura de inducción de 30°C a 27,5°C, 27°C, 26,5°C, 26°C, 25,5°C, 25°C, 24,5°C, 24°C, 24,5°C, 23°C, 22°C o 20°C;
 - usar un tampón sin urea durante la purificación,
 - y
 - b) eliminar el dominio variable único de inmunoglobulina que comprende uno o más residuos aminoacídicos carbamilados.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la carbamilación se reduce en la etapa de cultivar el hospedador.
3. Método según la reivindicación 2, en donde la carbamilación se reduce en la etapa de inducir al hospedador a producir el dominio variable único de inmunoglobulina.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la carbamilación se reduce en el caldo de cultivo después de la fermentación.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la carbamilación se reduce en el sobrenadante que comprende el dominio variable único de inmunoglobulina después de la eliminación del hospedador.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la carbamilación se reduce en cualquier etapa de purificación del dominio variable único de inmunoglobulina.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la carbamilación se reduce en la etapa del dominio variable único de inmunoglobulina purificada.
8. Método según la reivindicación 1, en donde los dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden uno o más residuos aminoacídicos carbamilados se eliminan mediante una o más técnicas cromatográficas.
9. Método según la reivindicación 8, en donde las técnicas cromatográficas son técnicas cromatográficas basadas en cambios en pl o hidrofobia, más preferentemente cromatografía de intercambio iónico.
10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina es un VHH, es un dominio variable único de inmunoglobulina derivado de un anticuerpo de cadena pesada de camello que ha sido humanizado, o es un dominio variable único de inmunoglobulina derivado de una inmunoglobulina humana que ha sido camelizada.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende al menos las etapas de cultivar el hospedador o la célula hospedadora para producir el dominio variable único de inmunoglobulina que comprende:
 - i) cultivar el hospedador o la célula hospedadora en condiciones que sean tales que el hospedador o la célula hospedadora se multiplique;
 - ii) mantener el hospedador o la célula hospedadora en condiciones que sean tales que el hospedador o la célula hospedadora exprese y/o produzca el dominio variable único de inmunoglobulina;
 - iii) opcionalmente seguido de aislar y/o purificar el dominio variable único de inmunoglobulina secretada del medio.
12. El método según la reivindicación 11, en donde las condiciones que reducen la carbamilación de uno o más residuos aminoacídicos en el dominio variable único de inmunoglobulina se aplican en una o más de la etapa i), etapa ii), después de la etapa ii), o en o después de la etapa iii), preferiblemente en la etapa ii).

Figura 1

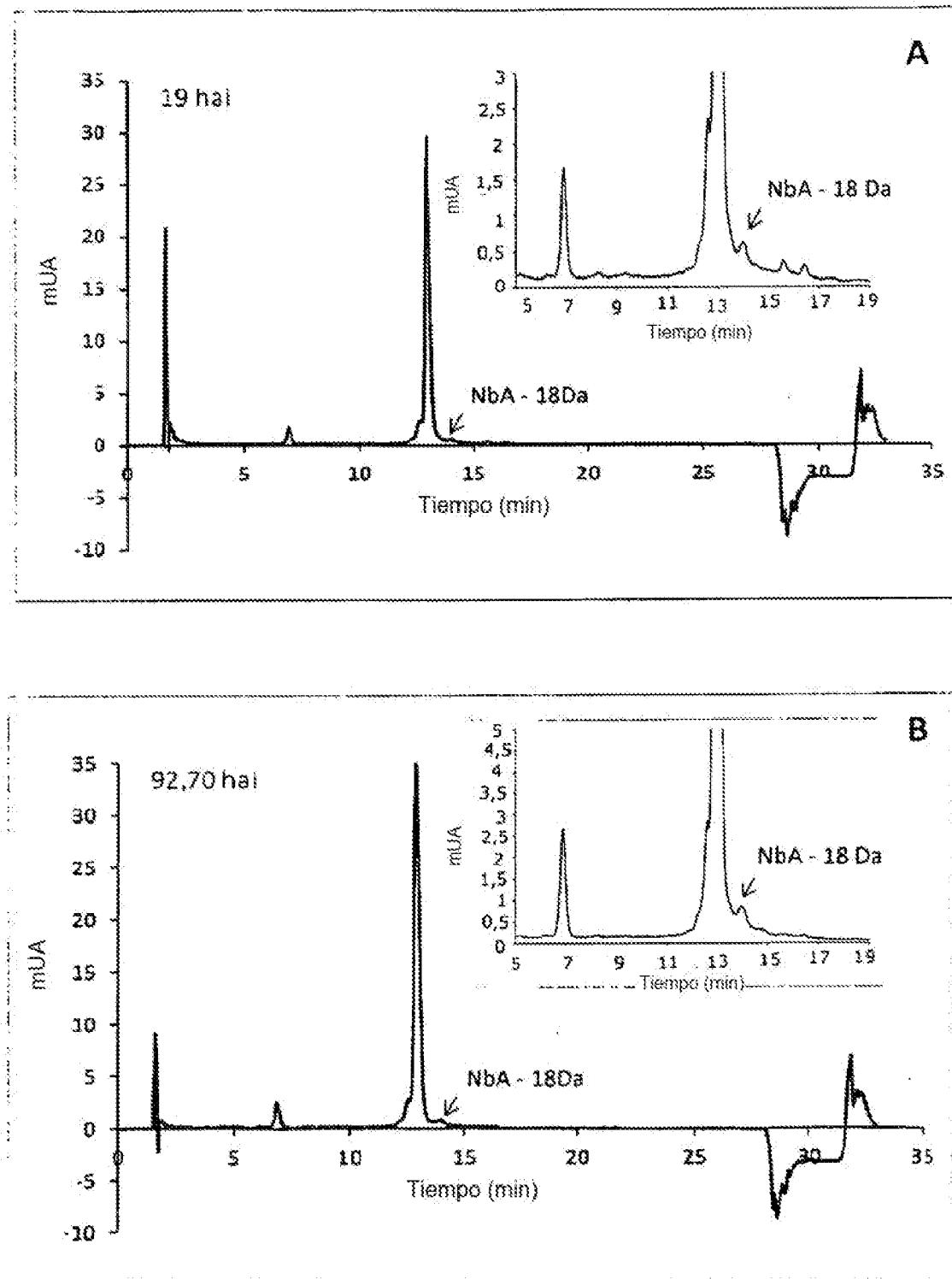


Figura 2

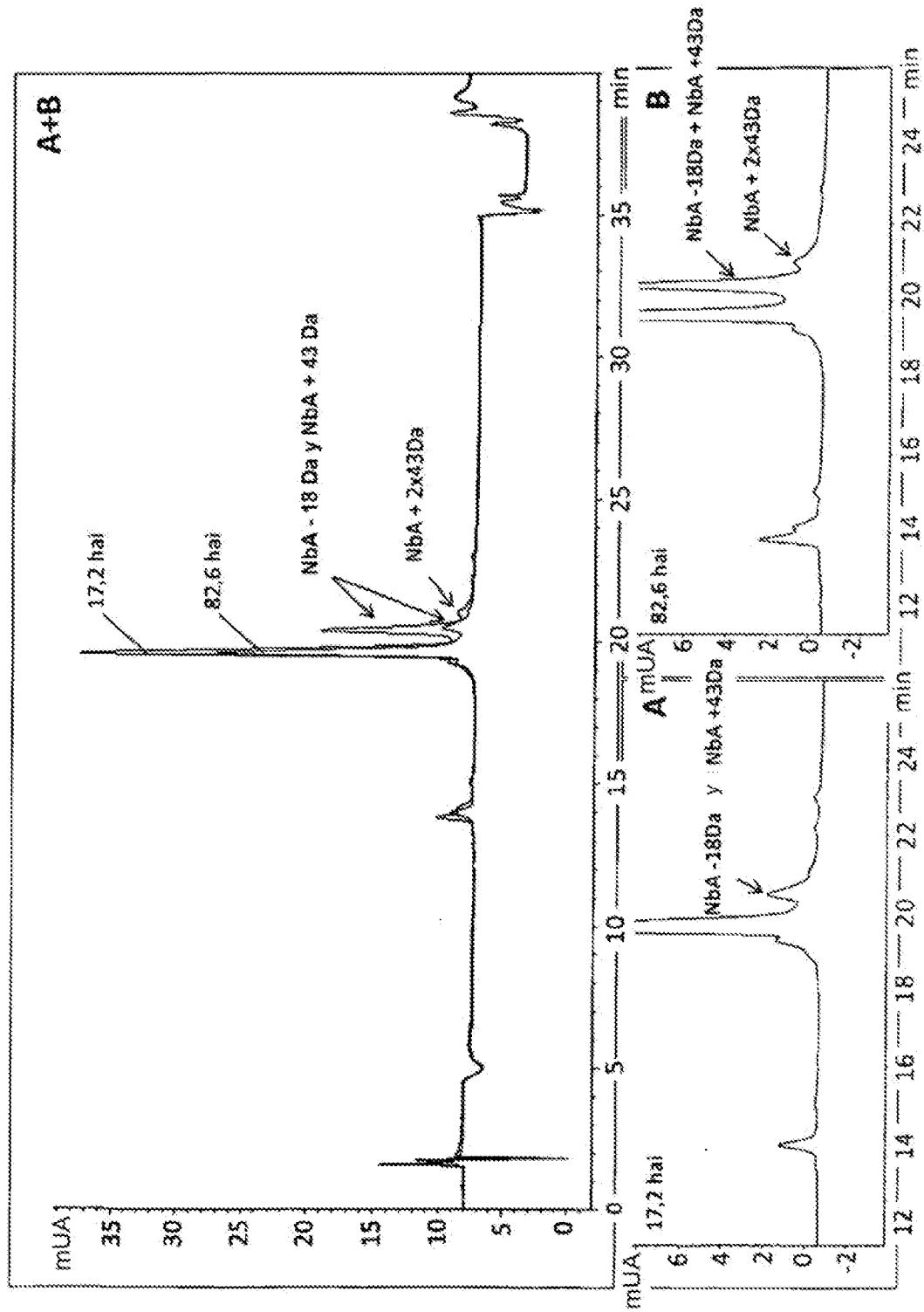


Figura 3

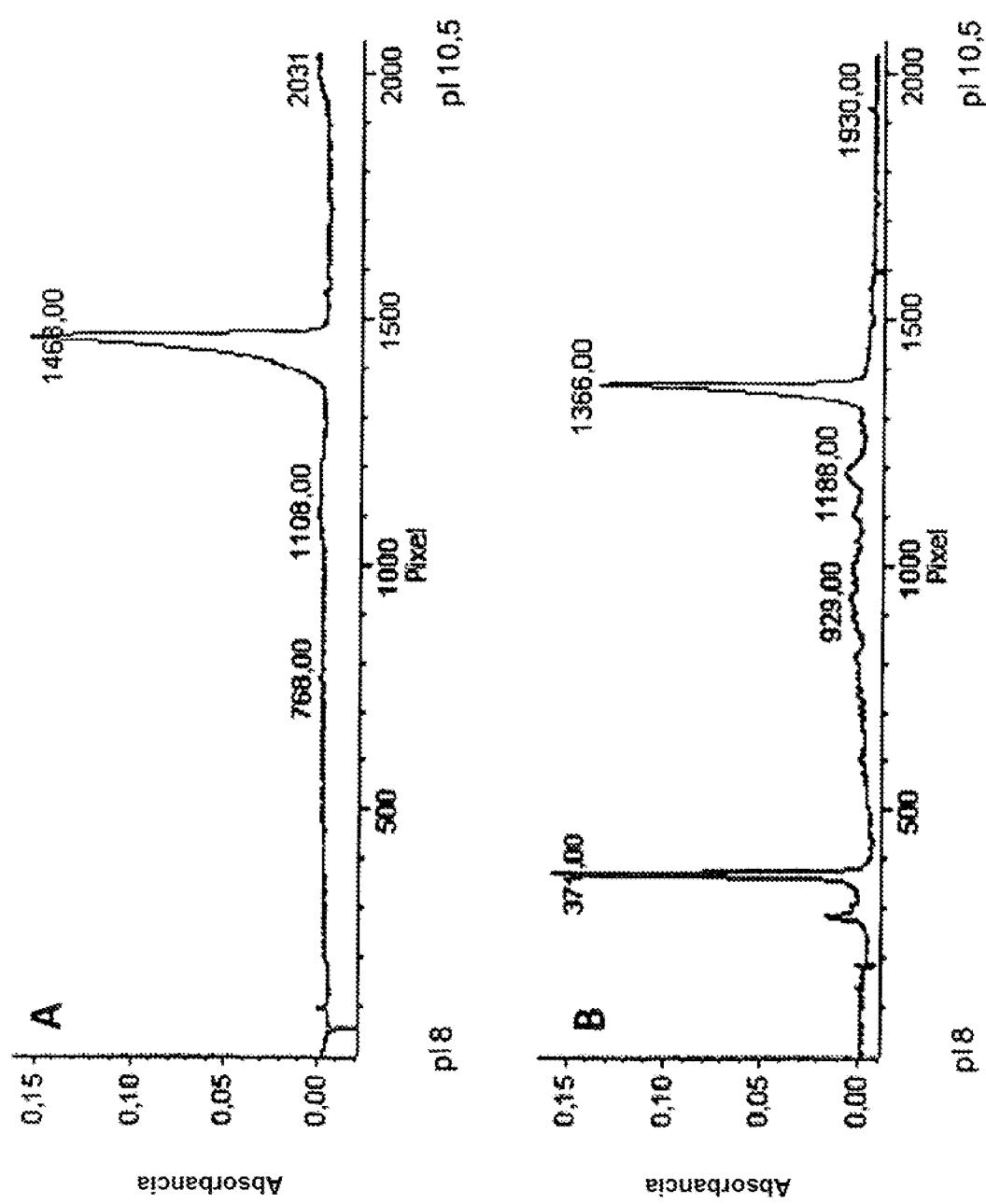


Figura 4

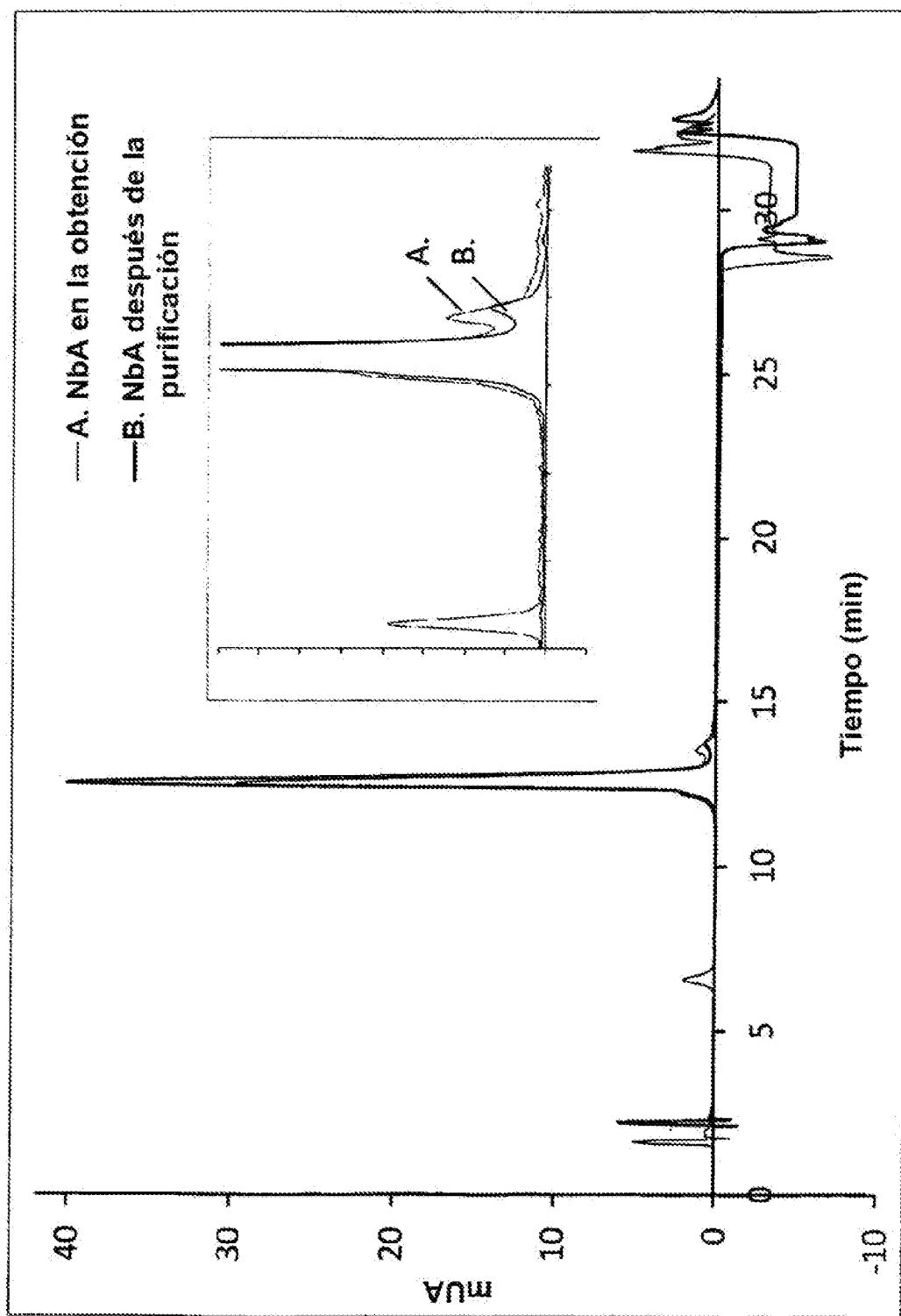


Figura 5

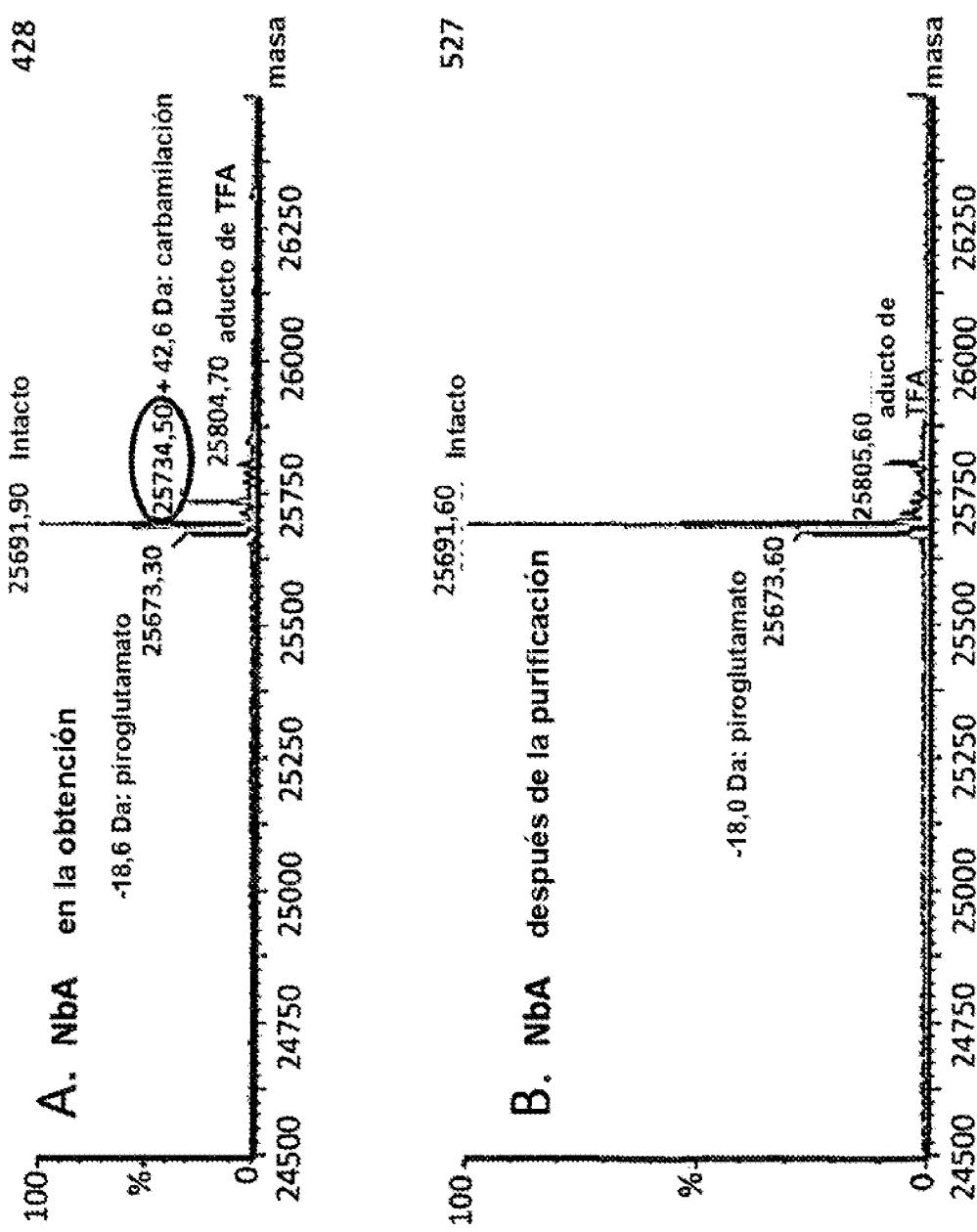


Figura 6

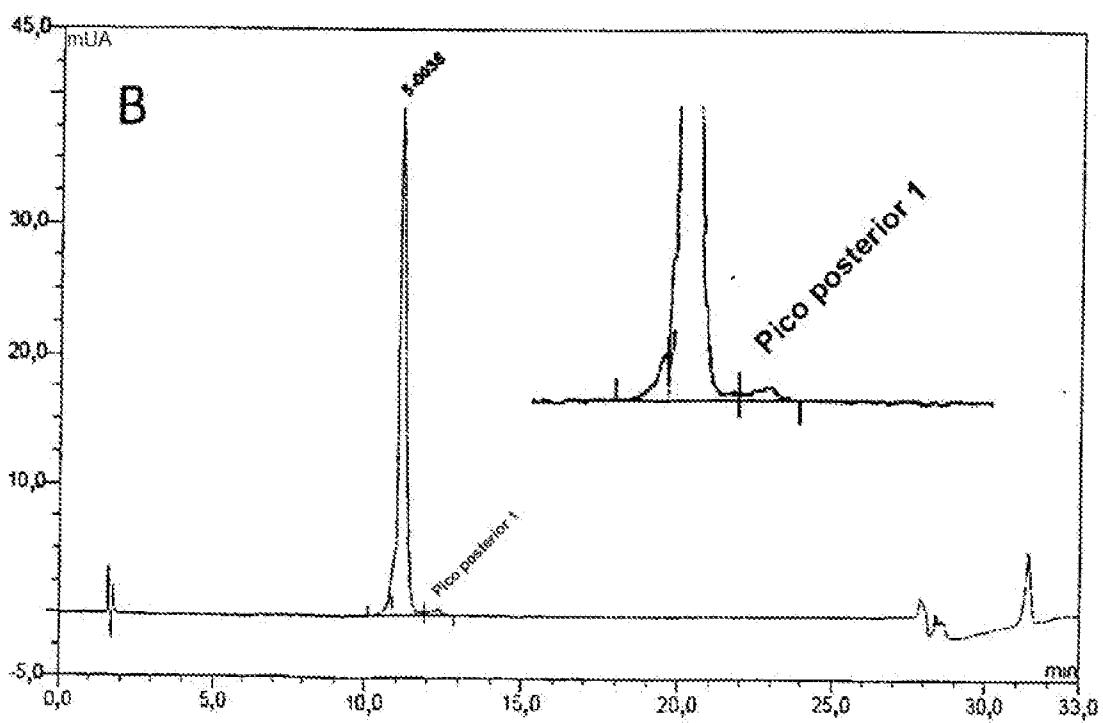
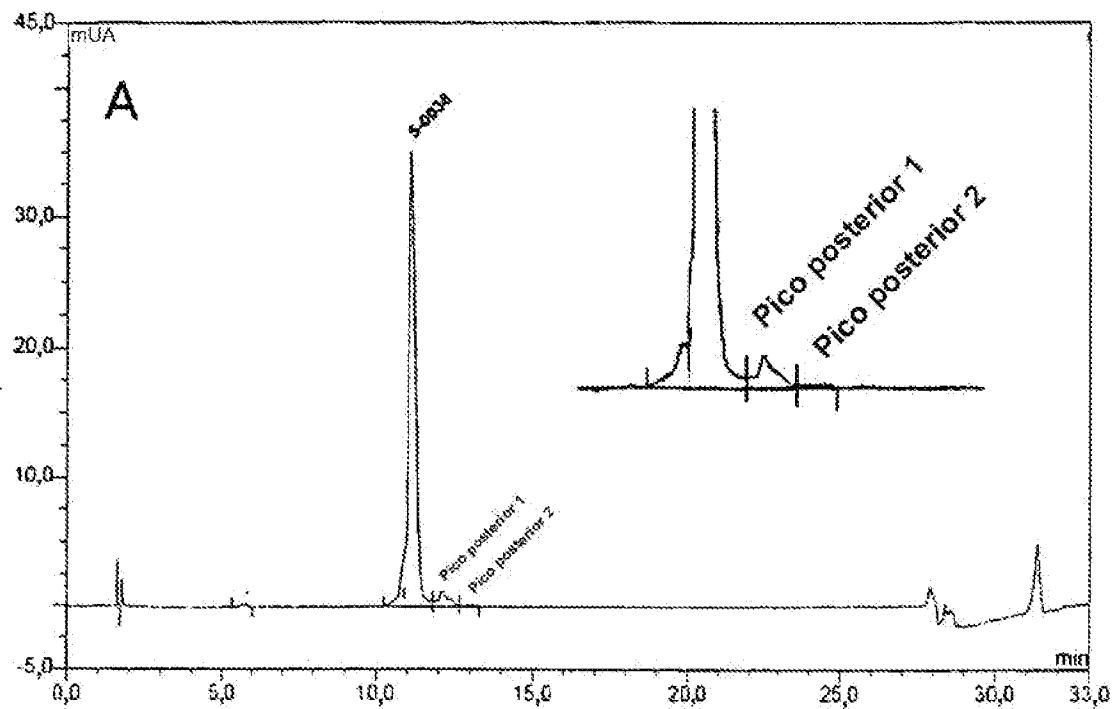


Figura 7

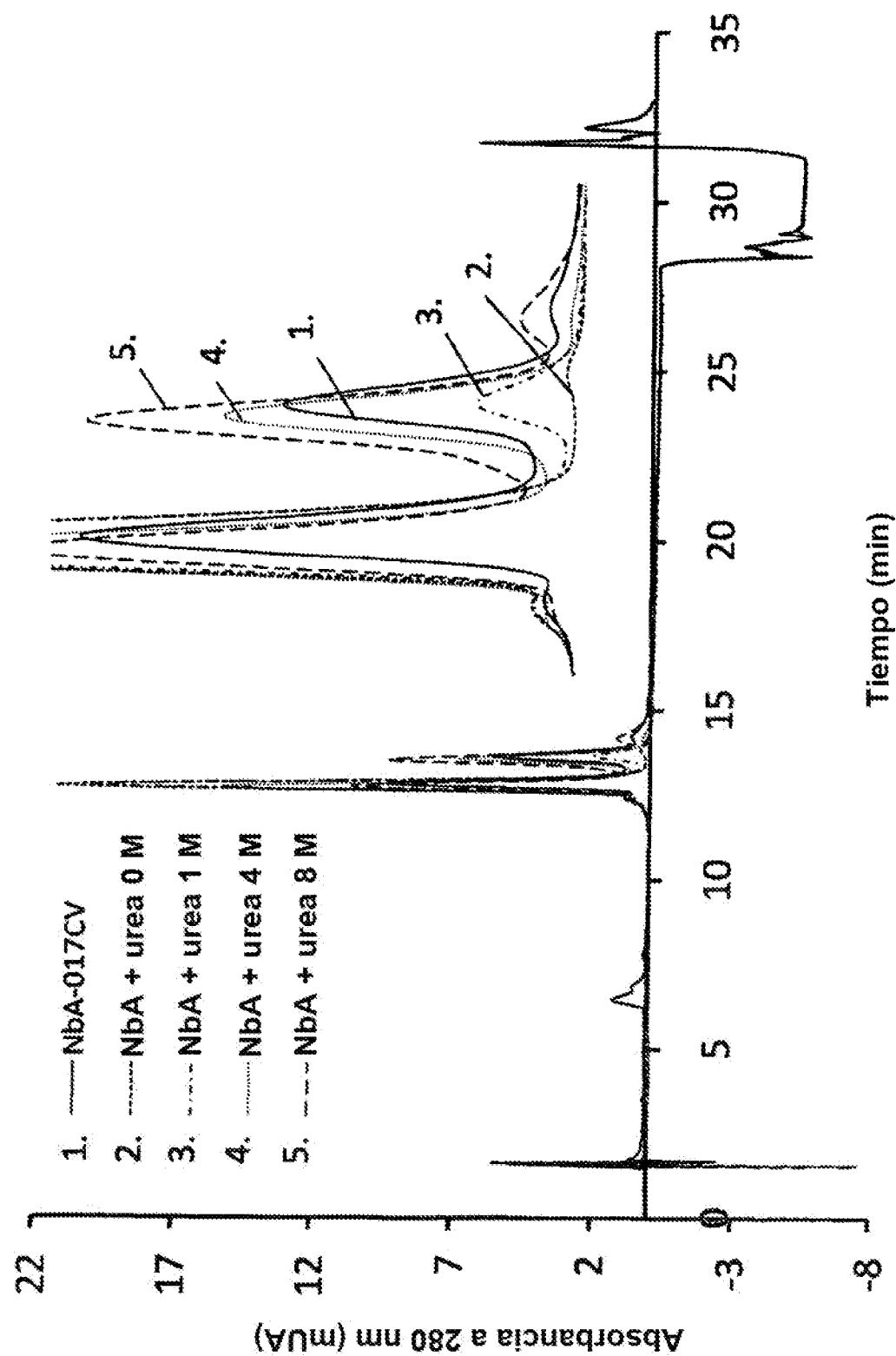


Figura 8

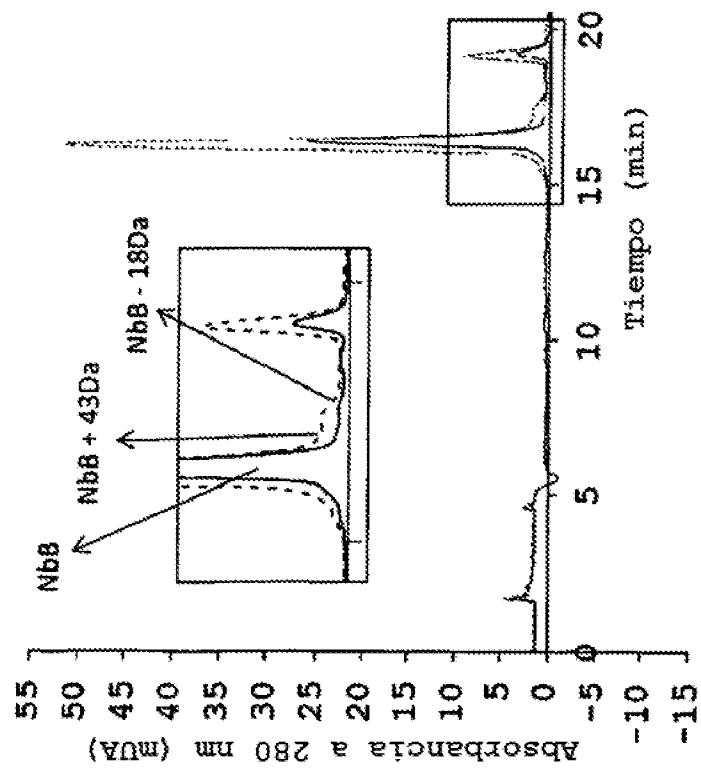


Figura 9

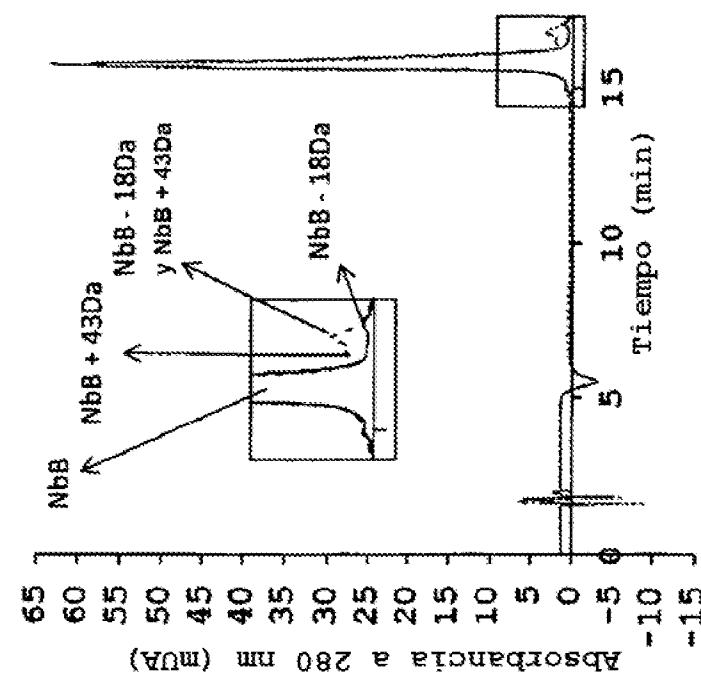


Figura 10

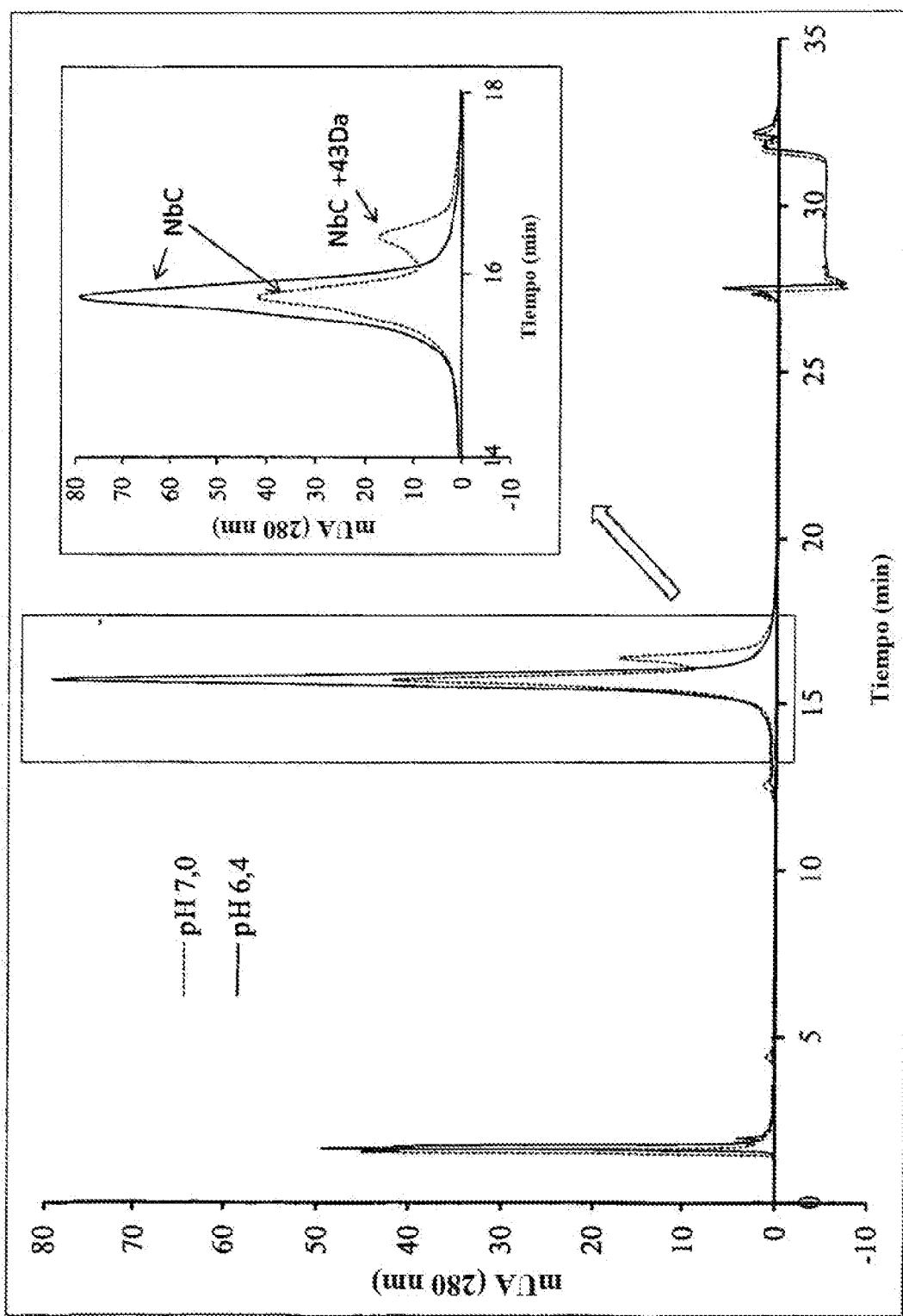


Figura 11

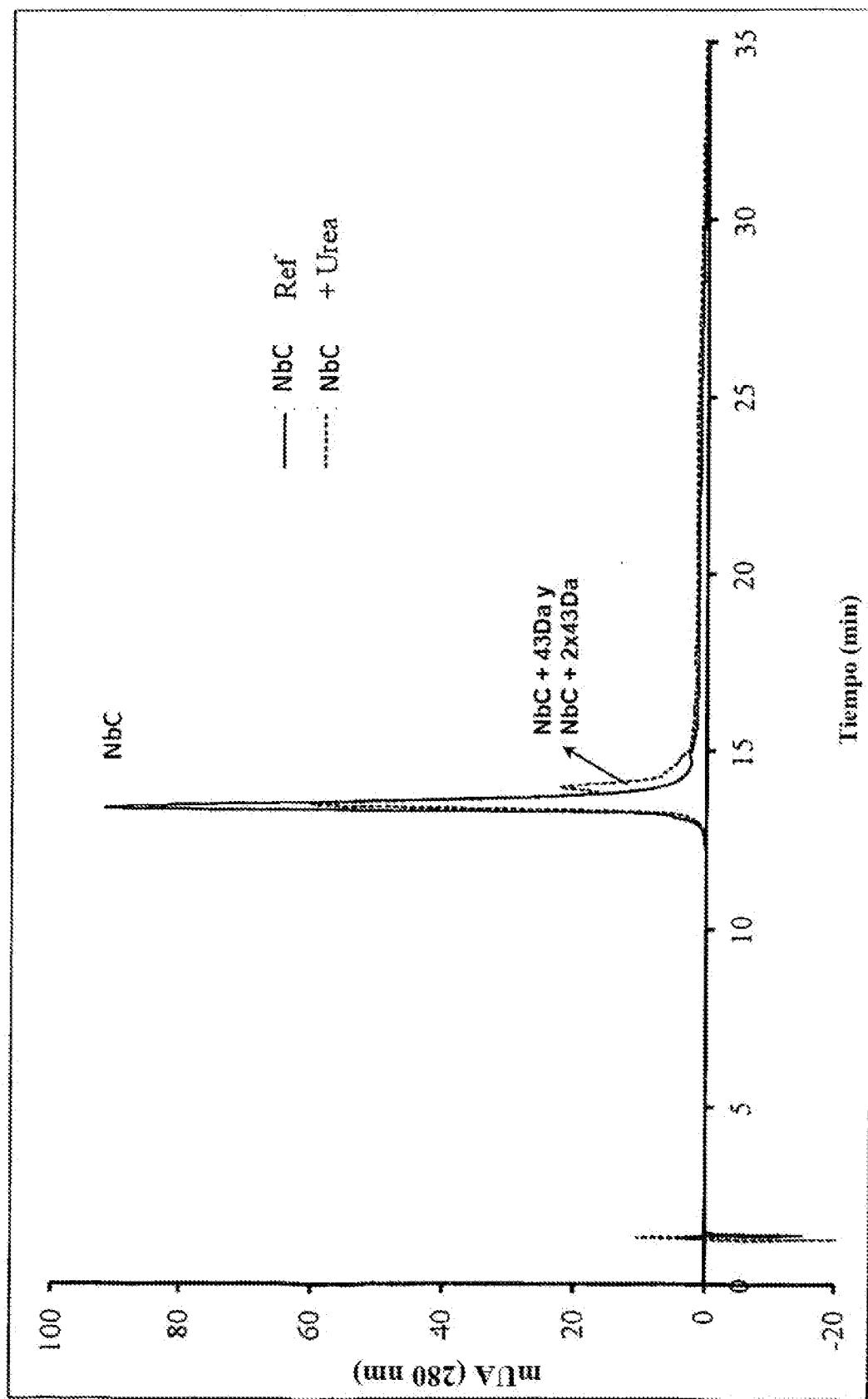


Figura 12

