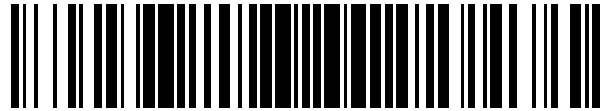


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 895**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011 PCT/EP2011/068982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 11775994 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2632946**

54 Título: **Método para la producción de dominios variables individuales de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

29.10.2010 US 408228 P

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 660 895 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 individuales de inmunoglobulina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la expresión de dominios variables individuales de inmunoglobulina en células huésped da como resultado una variante relacionada con el producto que comprende al menos un residuo de aminoácido carbamylado, en particular al menos un grupo carbamylamino.

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

20 **Antecedentes técnicos**

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

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

35 La inestabilidad química puede producirse, entre otras cosas, mediante desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, formación de piroglutamato, carbamylación, beta eliminación y/o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede producirse mediante desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción de anticuerpos. Entre ellas, se sabe que la agregación, la desamidación y la 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 notificado la limitación para obtener rendimientos adecuados de un producto funcional para las inmunoglobulinas convencionales y sus fragmentos a través de una amplia variedad 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 insecto 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 A diferencia de estas dificultades observadas, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden expresarse fácilmente en una forma completamente funcional en diferentes células huésped, como *E. coli* o *P. pastoris*, a una velocidad y nivel suficientes. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina se caracterizan por la formación del sitio de unión a antígeno mediante un dominio variable individual, 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 ejemplo específico de un dominio variable individual de inmunoglobulina, se ha descrito ampliamente por ejemplo en el documento WO 94/25591.

60 Por tanto, se desconoce el problema de obtener cantidades suficientes de producto funcional para los dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Sumario de la invención

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

Los presentes inventores han observado inesperadamente que pese al alto rendimiento y funcionalidad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina producidos en células huésped, hay una fracción de producto cuantitativamente significativa que representa una variante estructural. El análisis adicional de esta variante reveló que, inesperadamente, una fracción del producto comprende al menos un residuo de aminoácido carbamylado, en particular al menos un grupo carbamylamino. El hallazgo de cantidades considerables de una variante de este tipo fue completamente inesperado en la producción de dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a 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 de aminoácido carbamylado, en particular al menos un grupo carbamylamino, más específicamente un grupo carbamylamino N-terminal y/o al menos un grupo carbamylamino en una cadena lateral de una lisina y/o un residuo de arginina. En un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan métodos que reducen o eliminan la variante carbamylada relacionada con el producto. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de producción de dominios variables individuales de inmunoglobulina que superan este problema inesperado. Más específicamente, la presente solicitud describe métodos para reducir la carbamylación de dominios variables individuales de inmunoglobulina. Tales métodos pueden residir en adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, en lo que se refiere a pH, tiempo, temperatura, velocidad y/o composición de alimentación de metanol, pO₂ (concentración de oxígeno disuelto) y/o componentes del medio, tal como velocidad y/o composición de alimentación de glicerol, en particular en lo que se refiere a pH; y/o en adaptar las condiciones de purificación, en lo que se refiere a pH, temperatura, tiempos de retención y/o uso de (co)disolventes, en particular en lo que se refiere a pH.

La presente invención proporciona métodos de retirada de variantes carbamyladas, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para producir un dominio variable individual de inmunoglobulina en *Pichia pastoris* que comprende retirar los dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo de aminoácido carbamylado, en particular al menos un grupo carbamylamino.

Se describen métodos tal como se explicó resumidamente antes, en los que las condiciones que evitan la carbamylación de uno o más residuos de aminoácido, en particular la carbamylación de uno o más grupos amino, en dominios variables individuales de inmunoglobulina se seleccionan de una o más de las siguientes:

a) adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes:

- adaptar el pH de cultivo, preferiblemente el pH de inducción, en particular disminuir el pH de cultivo, preferiblemente el pH de inducción, en comparación con el pH de cultivo e inducción convencional para el organismo huésped, tal como disminuir el pH de cultivo, preferiblemente el pH de inducción, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, hasta 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;
- adaptar el tiempo de cultivo, en particular el tiempo de alimentación semicontinua de glicerol y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, en particular reducir el tiempo de cultivo, en particular el tiempo de alimentación semicontinua de glicerol y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, por ejemplo, en el 30-80 %, en comparación con el tiempo de cultivo, de alimentación semicontinua de glicerol y el tiempo de inducción convencionales para el organismo huésped, tal como disminuir el tiempo de inducción, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, desde aproximadamente 96 horas hasta un periodo de entre 24 y 96 horas, en particular hasta 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 disminuir el tiempo de alimentación semicontinua de glicerol, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, desde aproximadamente 16 hasta 18 horas hasta un periodo de entre 2 y 4 horas;
- adaptar la temperatura de cultivo, preferiblemente la temperatura de inducción, en particular disminuir la temperatura de cultivo, preferiblemente la temperatura de inducción, por ejemplo, en de 1 a 15 °C, tal como en 5 °C o en 10 °C, en comparación con la temperatura de cultivo e inducción convencionales para el organismo huésped, tal como disminuir la temperatura de inducción, para un huésped de *Pichia*, en particular *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;

- 5 - adaptar la saturación de oxígeno (concentración de oxígeno disuelto) del medio de cultivo, preferiblemente durante la inducción, en particular disminuir la concentración de oxígeno disuelto, por ejemplo, de 0,3 a 0,8 veces, en comparación con la concentración de oxígeno disuelto convencional para el huésped respectivo, tal como disminuir la concentración de oxígeno disuelto desde el 30 % hasta un intervalo entre el 5 % y el 24 %, por ejemplo hasta el 5 %, hasta el 15 % o hasta el 22,5 %, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*,
- 10 - adaptar la composición de alimentación de glicerol, preferiblemente durante la inducción, en particular disminuir el porcentaje de sustrato complejo (extracto de levadura y/o peptona) en la alimentación de glicerol en comparación con el porcentaje convencional de sustrato complejo en la alimentación de glicerol para el organismo huésped, por ejemplo, desde aproximadamente el 10 % hasta aproximadamente el 5 %, o desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 15 %, hasta aproximadamente el 10 % o hasta aproximadamente el 5 %, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, y/o adaptar la velocidad de alimentación de glicerol, en particular disminuir la velocidad de alimentación de glicerol en del 30 % al 80 % en comparación con la velocidad de alimentación de glicerol convencional para el huésped respectivo,
- 20 - adaptar los parámetros de inducción, incluyendo pero sin limitarse a, adaptación de la velocidad y/o composición de alimentación de metanol para huéspedes que requieren una alimentación de metanol, en particular aumentar o disminuir la velocidad de alimentación de metanol en del 30 % al 80 % en comparación con la velocidad de alimentación de metanol convencional para el huésped respectivo,
- 25 - y/u optimizar la composición del medio de cultivo, preferiblemente durante la inducción, incluyendo pero sin limitarse a, uso de medio libre de cianato, adición de extracto de levadura y/o peptona, o cualquier combinación de los mismos,
- 30 a) adaptar las condiciones de purificación mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: disminuir el pH, disminuir la temperatura, optimizar el medio de purificación, incluyendo pero sin limitarse a, evitar disolventes o codisolventes que contienen cianato, tal como urea y similares, disminuir los tiempos de retención y/o almacenamiento, o cualquier combinación de los mismos; y
- 35 b) combinaciones de cualquiera de las condiciones especificadas en a) y b).

La solicitud también describe métodos tal como se expuso anteriormente, en los que las medidas anteriores se emprenden en al menos una etapa de producción del dominio variable individual de inmunoglobulina, por ejemplo, en la etapa de cultivar el huésped para producir el dominio variable individual de inmunoglobulina, en particular en la fase de alimentación continua, semicontinua o de inducción; en el caldo de cultivo tras la fermentación; en el sobrenadante que comprende el dominio variable individual de inmunoglobulina tras la retirada del huésped; en cualquier etapa de purificación del dominio variable individual de inmunoglobulina; o en la fase del dominio variable individual de inmunoglobulina purificado.

La invención está relacionada con métodos tal como se describió anteriormente, en los que las condiciones que retiran dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo de aminoácido carbamilo, en particular al menos un grupo carbamilo, son técnicas cromatográficas, en particular técnicas cromatográficas basadas en cambios en pI y/o hidrofobicidad, tal como cromatografía de intercambio iónico (IEX) (por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento de 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).

En la invención, el huésped es *Pichia pastoris*.

El método de la presente invención produce dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden o que consisten esencialmente en, pero no se limitan a, un dominio variable individual 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 individual de inmunoglobulina que es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada, en particular un dominio variable individual de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dominio variable individual de inmunoglobulina) que es un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), un "dAc" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAc) o un Nanobody (incluyendo pero sin limitarse a, una secuencia de VHH), preferiblemente un Nanobody.

El método según la presente invención, tal como se describió anteriormente, comprende al menos las etapas de

cultivar el huésped para producir el dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende:

- i) cultivar dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará,
- ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina,
- iii) seguido opcionalmente por: aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio.

La solicitud describe métodos tal como se describió anteriormente, en los que se aplican condiciones que evitan la carbamitación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, en dominios variables individuales de inmunoglobulina, en una o más de la etapa i), la 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 los que se aplican condiciones que retiran dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden al menos un residuo de aminoácido carbamitado, en particular al menos un grupo carbamilamino, después de la etapa ii).

La solicitud también describe dominios variables individuales de inmunoglobulina que pueden obtenerse mediante cualquiera los métodos tal como se exponen en el presente documento, composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina, y usos terapéuticos de los dominios variables individuales de inmunoglobulina o métodos de tratamiento que comprende el uso de los dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Breve descripción de los dibujos

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 Dalton (NbA -18 Da) (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de luz en miliunidades de absorbancia (mUA); pieza insertada: ampliación de picos principales).

Figura 2. Cromatogramas de RP-HPLC de muestras de caldo clarificadas tomadas después de 17,2 (A) y después de 82,60 (B) horas tras 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 Dalton y una variante relacionada con Nanobody A con una diferencia de masa de +43 Dalton (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 Dalton (NbA 2x+43 Da) (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de luz en miliunidades de absorbancia (mUA); Panel superior: superposición de los cromatogramas de A y B).

Figura 3. Electroferogramas de cIEF obtenidos en el intervalo de pI de 8-10,5 a partir de un lote de referencia de Nanobody A (A) y a partir de Nanobody A carbamitado (muestra Nanobody A-017CV) (B). El cambio en el tiempo de retención del pico principal está producido por diferencias en el tampón de los dos lotes (eje X: posición de píxel (posición en capilaridad, intervalo de pH 8-10,5); eje Y: absorbancia en unidades de absorbancia (UA)).

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

Figura 5. Espectros deconvolucionados MaxEnt1 de los picos observados durante el análisis de CL-EM de lotes de Nanobody A tomados directamente después de la recogida (A) y después de la purificación (B) lo que demuestra la ausencia de Nanobody A carbamitado en el material purificado (eje X: masa en Dalton (Da); eje Y: (%)).

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

Figura 7. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC de lotes de Nanobody A tratados con urea 0 M, 1 M, 4 M u 8 M (tal como se indica) y de Nanobody A carbamitado (muestra Nanobody 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 una concentración de urea de urea (eje X: tiempo de retención en minutos (min); eje Y: absorbancia de luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

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

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

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

Figura 11. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC a partir del análisis de CL-EM de la referencia de Nanocuerpo C (línea continua) y Nanobody C incubados en urea 4 M durante 3 días a temperatura ambiente (línea discontinua). La variante a un T_{RR} 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 luz en miliunidades de absorbancia (mUA)).

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

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se indique o se defina de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que quedará claro para el experto. Por ejemplo, se hace referencia a los manuales convencionales, tal como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a Ed.), Vols. 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, Edinburgo (2001); Roitt *et al.*, "Roitt's Essential Immunology", 10.^a Ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6.^a Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general citada en el presente documento.

Dominio variable individual de inmunoglobulina

El término "dominio variable individual de inmunoglobulina", usado de manera intercambiable con "dominio variable individual", define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio individual de inmunoglobulina. Esto diferencia los dominios variables individuales de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir, un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación del sitio de unión a antígeno.

En contraposición, el sitio de unión de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por un dominio individual VH o VL. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

Por tanto, el término "dominio variable individual de inmunoglobulina" y "dominio variable individual" no comprende inmunoglobulinas convencionales ni sus fragmentos que requieren interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión a antígeno. Sin embargo, estos términos sí comprenden fragmentos de

inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable individual.

5 En general, los dominios variables individuales serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (de FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3, respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de aminoácidos de este tipo (que entonces contendrá habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las CDR, tal como se describe adicionalmente en el presente documento). Tales dominios variables individuales y fragmentos son lo más preferiblemente de manera que comprenden un plegamiento de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un plegamiento de inmunoglobulina. Como tal, el dominio variable individual puede comprender por ejemplo una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de VH o secuencia de VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno individual (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable individual, de manera que no es necesario que el dominio de unión a antígeno individual interactúe con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, como es por ejemplo el caso para los dominios variables que están presentes, por ejemplo, en 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 a antígeno funcional).

20 Por ejemplo, el dominio variable individual de un dominio variable individual de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dominio variable individual de inmunoglobulina) puede ser un anticuerpo de dominio (individual) (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio (individual)), un "dAc" o dAc (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAc) o un Nanobody (tal como se define en el presente documento, e incluyendo pero sin limitarse a, una secuencia de VHH) [Nota: Nanobody® y Nanobodies® son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V.]; otros dominios variables individuales, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de dominio (individual), también se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0 368 684. Para el término "dAc", se hace referencia por ejemplo a Ward *et al.* (Nature, 12 de octubre de 1989; 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.*, Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; así como por ejemplo a los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. Debe indicarse que, aunque menos preferido en el contexto de la presente invención porque no son de origen mamífero, los anticuerpos de dominio (individual) o dominios variables individuales pueden derivarse de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

40 En particular, la secuencia de aminoácidos de la invención 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 en la técnica anterior general: documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit, Bruselas; documentos 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; documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; documento WO 01/90190 del National Research Council de Canadá; documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Institute of Antibodies; así como los documentos 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 adicionales de Ablynx N.V. También se hace referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionada en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Tal como se describe en estas referencias, los Nanobodies (en particular, secuencia de VHH y Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de región de entramado. Una descripción adicional de los Nanobodies, incluyendo la humanización y/o camelización de los Nanobodies, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de Nanobody", constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias de ligador) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobodies y sus preparaciones pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

60 Por tanto, en el significado de la presente invención, el término "dominio variable individual de inmunoglobulina" o "dominio variable individual" comprende polipéptidos que se derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camello. Pueden humanizarse, tal como se describió anteriormente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes no camélidas, por ejemplo, ratón o humano, que pueden "camelizarse", tal como se describió anteriormente.

65 A menos que se indique otra cosa, el término "secuencia de inmunoglobulina" (ya se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional) se usa como término

5 general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño complejo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo pero sin limitarse a, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan de manera intercambiable con secuencia de inmunoglobulina, e incluyen Nanobodies.

10 En una realización de la invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de VL), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de VH); más específicamente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

15 Los dominios variables individuales de inmunoglobulina proporcionados por la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de una proteína o polipéptido de la invención (tal como se define en el presente documento), que pueden comprender o que consisten esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina y que pueden comprender además opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales (unidos todos ellos opcionalmente a través de uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden usarse como unidad de unión en una proteína o polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir, contra una o más de otras dianas), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente, tal como se describe en el presente documento. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento).

20 La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de origen diferente, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humano y camélido. La invención también incluye secuencias de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o dominios variables individuales de inmunoglobulina camelizados, por ejemplo, dAc camelizados tal como se describe por Ward *et al* (véase por ejemplo el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Además, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo, que forman un constructo multivalente y/o multiespecífico (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, se hace referencia también a Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001, así como por ejemplo a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprende etiquetas y otros restos funcionales, por ejemplo, toxinas, marcadores, restos radioquímicos, etc., que pueden derivarse de las secuencias de inmunoglobulina de la presente invención.

25 Puede considerarse que la secuencia de aminoácidos y la estructura de una secuencia de inmunoglobulina, en particular un Nanobody, aunque sin limitarse a ello, se compone de cuatro regiones de entramado o "FR", que se denominan en la técnica y en el presente documento "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

30 Según la invención, el término dominios variables individuales de inmunoglobulina también engloba constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominios variables individuales, tal como se explicó resumidamente antes. Por ejemplo, pueden unirse dos (o más) dominios variables individuales de inmunoglobulina con especificidad de antígeno igual o diferente para formar por ejemplo, un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Mediante la combinación de dominios variables individuales de inmunoglobulina de dos o más especificidades, pueden formarse constructos biespecíficos, trispecíficos, etc. Por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulina según la invención puede comprender dos o tres dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos contra la misma diana, o dos dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos contra la diana A, y un dominio variable individual de inmunoglobulina contra la diana B. Tales constructos y modificaciones de los mismos, que el experto puede prever fácilmente, están englobados todos ellos por el término dominio variable individual de inmunoglobulina tal como se usa en el presente documento.

35 El número total de residuos de aminoácido en un Nanobody puede estar en la región de 110-120, preferiblemente es de 112-115, y lo más preferiblemente es de 113. Sin embargo, debe indicarse que las partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales explicados resumidamente en el presente documento y también son adecuados preferiblemente para los fines descritos en el presente documento.

Todas estas moléculas también se denominan “polipéptido de la invención”, que es sinónimo de “secuencias de inmunoglobulina de la invención”.

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

10 *Huéspedes*

Los términos “huésped” y “células huésped” se usan de manera intercambiable. Los métodos de la presente invención pueden usar cualquier huésped de *P. pastoris* sin limitación, siempre que sean adecuados para la producción de un dominio variable individual de inmunoglobulina. En particular, la presente invención se refiere a huéspedes de *P. pastoris* que producen dominios variables individuales de inmunoglobulina, en los que una parte del dominio variable individual de inmunoglobulina producido comprende al menos un residuo de aminoácido carbamylado, en particular al menos un grupo carbamylamino.

El huésped de *P. pastoris* para su uso en los métodos de la presente invención será capaz de producir un dominio variable individual de inmunoglobulina. Normalmente se modificará genéticamente para comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifiquen para uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina. Los ejemplos no limitativos de modificaciones genéticas comprenden la transformación por ejemplo, con un plásmido o vector, o la transducción con un vector viral. Algunos huéspedes pueden modificarse genéticamente mediante técnicas de fusión. Las modificaciones genéticas incluyen la introducción de moléculas de ácido nucleico individuales en un huésped, por ejemplo, plásmidos o vectores, así como modificaciones directas del material genético del huésped, por ejemplo, mediante la integración en un cromosoma del huésped, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Con frecuencia se producirá una combinación de ambas, por ejemplo, un huésped se transforma con un plásmido que, tras recombinación homóloga se integrará (al menos parcialmente) en el cromosoma del huésped. El experto conoce métodos adecuados de modificación genética del huésped para permitir que el huésped produzca dominios.

20 *Residuos de aminoácido carbamylados*

Tal como se describió anteriormente, la carbamylación (también denominada “carbamoilación”) se refiere a la transferencia de un grupo carbamilo (también denominado “grupo carbamoilo”), es decir, un grupo NH₂-CO, desde una molécula que contiene carbamilo (por ejemplo, cianato) hasta un resto aceptor, tal como un grupo amino, sulfhidrilo, carboxilo, fenólico, hidroxilo, imidazol y fosfato de residuos de aminoácido, según el esquema general: HNCO + RXH = RXCONH₂.

Los grupos carbamylamino en proteínas resultan generalmente de la reacción de cianato con grupos amino en proteínas, en particular con el amino terminal de proteínas (también conocido como N-terminal, NH₂-terminal, extremo N-terminal o amino terminal) y/o con grupos amino en 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 mediante enlaces sencillos a átomos de hidrógeno, grupos alquilo, grupos arilo, o una combinación de ellos. Sin embargo, sigue sin conocerse el mecanismo exacto para la carbamylación de proteínas en *Pichia*.

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

Ha de entenderse que cualquier referencia a un grupo amino también se refiere a más de un grupo, es decir, a grupos amino, a menos que se especifique de otro modo.

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

60 Métodos generales

El experto conocerá métodos generales para producir dominios variables individuales de inmunoglobulina en células huésped.

Por ejemplo, la producción de Nanobodies en huésped procariontes tales como *E. coli* se ha descrito ampliamente (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 huéspedes eucariotas inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito ampliamente en el documento WO 94/25591. El contenido de estas solicitudes se refiere explícitamente a la relación con técnicas y métodos de cultivo generales, incluyendo medios y condiciones adecuados. El experto también puede idear constructos genéticos adecuados para la expresión de dominios en células huésped basándose en el conocimiento general común. La presente invención también se refiere a condiciones específicas y a constructos genéticos descritos en la técnica, por ejemplo los métodos de cultivo generales, plásmidos, promotores y secuencias líder descritos en el documento 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 individuales de inmunoglobulina, en particular Nanobodies, producidos por las células huésped, se observa la presencia de residuos de aminoácido carbamilados, en particular grupos carbamilamino, tales como grupos amina amino-terminales carbamilados y/o grupos amina carbamilados en la cadena lateral de residuos de lisina y arginina. La presencia de estos residuos de aminoácido carbamilados podría tener un impacto sobre la calidad y la homogeneidad del producto de Nanobody final. Sin embargo, un producto de alta calidad y la homogeneidad son un requisito previo, por ejemplo, para el uso terapéutico de estos productos.

La presente solicitud describe métodos para la fabricación de dominios variables individuales de inmunoglobulina en los que se mejora la calidad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina (es decir, con un nivel reducido de residuos de aminoácido carbamilados, en particular de grupos carbamilamino, o su ausencia). La calidad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina se mejora aplicando condiciones especificadas en las que se evita la formación del/de los residuo(s) de aminoácido carbamilado durante el crecimiento del huésped, durante la expresión del dominio variable individual de inmunoglobulina, y/o tras la expresión (es decir, antes o después de la purificación del dominio variable individual de inmunoglobulina). La presente invención proporciona métodos de retirada de la variante carbamilada relacionada con el producto.

Se entiende igualmente que cualquier referencia a condiciones que evitan la formación de residuo(s) de aminoácido carbamilado, en particular de grupo(s) carbamilamina, significa condiciones que eliminan o reducen la formación de la variante carbamilada relacionada con el producto, y viceversa.

Retirada significa que la variante carbamilada relacionada con el producto se separa físicamente de la mezcla de dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprende tanto la especie dominio variable individual de inmunoglobulina deseada que no tiene grupos amina carbamilados, como la variante carbamilada relacionada con el producto. El significado correcto resultará evidente a partir del contexto.

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

- i) cultivar un huésped o célula huésped (tal como se define en el presente documento) en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará (también denominada fase de producción de biomasa, que incluye la fase discontinua y la fase semicontinua, por ejemplo, la fase semicontinua de glicerol),
- ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina (también denominada fase de inducción),
- iii) seguido opcionalmente por aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio, en el que se aplican condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, 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 una realización, la solicitud describe condiciones que evitan que se aplique carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, en la etapa i). Por consiguiente, un método de este tipo comprende al menos las etapas de:

- i) cultivar un huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará y que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, por ejemplo, incluyendo al menos las siguientes: adaptar las condiciones de cultivo mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: adaptar el pH de cultivo, adaptar el tiempo de cultivo, adaptar la temperatura de cultivo, adaptar la saturación de oxígeno, adaptar la composición de alimentación de glicerol y/o la velocidad de alimentación de glicerol, y/u optimizar la composición del medio de cultivo, incluyendo pero sin limitarse a, el uso de medio libre de cianato, o cualquier combinación de los mismos;
- ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula

huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina;

iii) seguido opcionalmente por aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio.

5 En una realización, la solicitud describe condiciones que evitan que se aplique carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, en la etapa ii). Por consiguiente, dicho método comprende al menos las etapas de:

10 i) cultivar un huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;

15 ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina y que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, por ejemplo, incluyendo al menos las siguientes: adaptar las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción, mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: adaptar el pH de 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 de alimentación de glicerol, en particular durante la fase de inducción, y/o la velocidad de alimentación de glicerol; adaptar los parámetros de inducción incluyendo pero sin limitarse a, adaptación de la velocidad y/o composición de alimentación de metanol para huéspedes que requieren una alimentación de metanol; y/u optimizar la composición del medio de cultivo, en particular durante la fase de inducción, incluyendo pero sin limitarse a, uso de medio libre de cianato, o cualquier combinación de los mismos;

25 iii) seguido opcionalmente por aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio.

30 En una realización, la solicitud describe condiciones que evitan que se aplique carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino después de la etapa ii). En una realización de la invención, las condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, se aplican antes de la iii).

35 Por consiguiente, el método para producir un dominio variable individual de inmunoglobulina en un huésped comprende al menos las etapas de:

i) cultivar un huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;

40 ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina;

45 iii) mantener el dominio variable individual de inmunoglobulina obtenido en etapa ii) en condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, 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;

50 iv) seguido opcionalmente por aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio.

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

55 Por consiguiente, el método para producir un dominio variable individual de inmunoglobulina en un huésped comprende al menos las etapas de:

i) cultivar un huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;

60 ii) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son de manera que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina;

65 iii) aislar y/o purificar el dominio variable individual de inmunoglobulina secretado del medio y aplicar condiciones que evitan la carbamilación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, por ejemplo, adaptando las condiciones de purificación mediante una o más medidas seleccionadas de las siguientes: disminuir el pH, disminuir la temperatura, optimizar el medio de purificación, incluyendo pero sin

limitarse a, evitar disolventes o codisolventes que contienen cianato, tal como urea y similares, disminuir los tiempos de retención y/o almacenamiento, o cualquier combinación de los mismos.

5 La presente solicitud también describe la combinación de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, la presente solicitud describe cultivar y mantener el huésped en condiciones que impiden y/o reducen la formación de la variante relacionada con el producto que comprende al menos un residuo de aminoácido carbamylado, en combinación con mantener el dominio variable individual de inmunoglobulina en condiciones que impiden y/o reducen la formación de la variante carbamylada relacionada con el producto o que conducen a la retirada o reducción de la variante carbamylada relacionada con el producto. El experto puede prever una combinación adicional adecuada basándose en la enseñanza de la presente solicitud. Preferiblemente, en cada etapa de la producción del dominio variable individual de inmunoglobulina, se aplican condiciones que impiden y/o reducen la formación de la variante carbamylada relacionada con el producto.

15 En la presente invención, el huésped puede retirarse del medio de cultivo mediante medios de rutina. Por ejemplo, el huésped puede retirarse mediante centrifugación o filtración. La disolución obtenida retirando del huésped del medio de cultivo también se denomina sobrenadante de cultivo, o sobrenadante de cultivo clarificado.

20 Según la presente invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden purificarse mediante métodos convencionales del sobrenadante de cultivo. Los métodos convencionales incluyen, pero no se limitan a métodos cromatográficos, incluyendo cromatografía de exclusión molecular, cromatografía hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos métodos pueden realizarse 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 individuales de inmunoglobulina basándose en el 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 carbamylación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, también puede aplicarse en o entre cualquier etapa de estos métodos de purificación.

30 A continuación, se comentan en más detalle ejemplos particulares de condiciones que evitan la carbamylación de uno o más residuos de aminoácido, en particular de uno o más grupos amino, adecuadas para los métodos según la presente invención. La aplicación de estas condiciones también se denominará "tratamiento" del dominio variable individual de inmunoglobulina.

35 La carbamylación puede evitarse adaptando el pH. Si el tratamiento se realiza durante el cultivo, en particular la fase de inducción en presencia del huésped, se escogerá el pH para que sea adecuado para el huésped. Tras la retirada del huésped, puede escogerse el pH en un intervalo más amplio, por ejemplo, de desde pH 3 hasta 6. Ejemplos específicos de pH adecuado en el que pueden realizarse diversos tratamientos para evitar la carbamylación durante el cultivo, en particular la fase de inducción en presencia del huésped, en particular un huésped de *Pichia*, tal como *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.

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

50 La temperatura de tratamiento dependerá de la fase de aplicación del tratamiento. Si el tratamiento se realiza durante el cultivo, en particular la fase de inducción del huésped, la temperatura de tratamiento será igual que la temperatura de cultivo y/o inducción para ese huésped, o por debajo de la temperatura de cultivo y/o inducción. El experto conoce temperaturas de cultivo e inducción adecuadas para diferentes huéspedes. Si el tratamiento se realiza en presencia del huésped pero a una temperatura reducida, la temperatura puede ser por ejemplo, de 1 °C a 15 °C, tal como 5 °C o 10 °C, por debajo de la temperatura de cultivo y/o inducción empleada habitualmente para el huésped respectivo. Temperaturas de tratamiento a modo de ejemplo que pueden aplicarse durante la fase de cultivo y/o inducción del huésped, en particular un huésped de *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*, son 20 °C, 22 °C, 23 °C, 24,5 °C, 25 °C, 25,5 °C, 26 °C, 26,25 °C, 26,75 °C o 27,5 °C.

60 Tras la retirada del huésped, la temperatura puede disminuirse adicionalmente. Una temperatura de tratamiento preferible es temperatura ambiente (20 °C-25 °C).

65 Tras la retirada del huésped, el dominio variable individual de inmunoglobulina puede presentarse en una amplia variedad de tampones adecuados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o Tris-HCl. El dominio variable individual de inmunoglobulina también puede presentarse en solución

salina fisiológica. Preferiblemente, el dominio variable individual de inmunoglobulina se presenta en un tampón que no contiene urea ni cianato.

5 Posteriormente a cualquiera, o a cualquier combinación de tratamientos según la presente invención, el dominio variable individual de inmunoglobulina puede transferirse a un nuevo sistema tampón, si se desea. La transferencia puede llevarse a cabo mediante medios de rutina. Por ejemplo, el dominio variable individual de inmunoglobulina puede transferirse a PBS mediante diálisis. El dominio variable individual de inmunoglobulina también puede transferirse a solución salina fisiológica. El experto puede elegir fácilmente otros sistemas tampón adecuados.

10 Los tratamientos anteriores pueden realizarse en diferentes etapas del procedimiento de cultivo:

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

15 En una realización adicional de la solicitud, que puede emplearse sola o en combinación con cualquier otra realización tal como se describe en el presente documento para reducir la formación de las variantes relacionadas con el producto con residuos de aminoácido carbamylados, en particular de grupos carbamylamino, pueden adaptarse las condiciones de cultivo, en particular las condiciones de inducción.

20 El experto conoce condiciones de cultivo convencionales, incluyendo condiciones de inducción, para huéspedes adecuados para la producción recombinante de dominios variables individuales de inmunoglobulina.

25 Como ejemplo específico, la levadura *Pichia*, en particular *P. pastoris*, normalmente se cultiva como un cultivo de alta densidad celular (alimentación semicontinua de glicerol) y la inducción se inicia mediante la adición de metanol. El protocolo convencional 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/h. El experto conocerá métodos para el cultivo de *Pichia* y se describen, por ejemplo, en *Methods in Molecular Biology™*, *Pichia* protocols, segunda edición, Humana Press.

30 En comparación con las condiciones convencionales incluyendo, pero sin limitarse a las ejemplificadas para *P. pastoris*, pueden aplicarse una o más medidas seleccionadas de las siguientes adaptaciones de condiciones de cultivo, en particular condiciones de inducción, para reducir la formación de variantes carbamyladas relacionadas con el producto: adaptar el pH de cultivo, preferiblemente el pH de inducción; adaptar el tiempo de cultivo, preferiblemente 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 alimentación de glicerol, en particular el porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol, preferiblemente durante la fase de inducción, y/o la velocidad de alimentación de glicerol; adaptar los parámetros de inducción incluyendo pero sin limitarse a, adaptación de la velocidad y/o composición de alimentación de metanol para huéspedes que requieren una alimentación de metanol; y/u optimizar la composición del medio de cultivo, en particular durante la fase de inducción, incluyendo pero sin limitarse a, uso de medio libre de cianato, adición de extracto de levadura y/o peptona, o cualquier combinación de los mismos.

45 La siguiente descripción detallada se facilitará en el contexto del protocolo convencional (el protocolo de Invitrogen) para cultivar *P. pastoris*, tal como se expuso anteriormente. El experto estará fácilmente en una posición para adaptar esta enseñanza a los protocolos convencionales usados para otros huéspedes. Por ejemplo, cuando la temperatura convencional para cultivar *P. pastoris* es de 30 °C, la temperatura de cultivo puede adaptarse por ejemplo, a 25 °C. El experto tiene claro que para otro huésped, la temperatura de cultivo convencional que es de 37 °C, 32 °C o 30 °C puede representar una adaptación similar de la temperatura de cultivo.

50 Una posible adaptación de las condiciones de cultivo, en particular de las condiciones de inducción, para reducir la formación de variantes carbamyladas relacionadas con el producto se refiere a un pH de cultivo y/o inducción adaptado, en particular a una reducción del pH de cultivo y/o inducción en comparación con el pH de cultivo y/o inducción convencional para el organismo huésped. Un ejemplo de un pH de cultivo y/o inducción adaptado, en particular un pH de cultivo y/o inducción reducido, para un huésped de *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*, es una adaptación hasta un pH de aproximadamente 6,45 o menos, hasta un pH de 6,4 o menos, hasta un pH de aproximadamente 6,3 o menos, hasta un pH de aproximadamente 6,25 o menos, hasta un pH de aproximadamente 6,2 o menos, hasta un pH de aproximadamente 6,1 o menos, hasta un pH de aproximadamente 6 o menos, hasta un pH de aproximadamente 5,7 o menos, hasta un pH de aproximadamente 5,6 o menos, hasta un pH de aproximadamente 5,5 o menos, hasta un pH de aproximadamente 5 o menos, en particular hasta 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.

60 Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes carbamyladas relacionadas con el producto, que van a aplicarse solas o junto con el pH adaptado de cultivo y/o inducción, o cualquier otra realización descrita en el presente documento, es una adaptación del tiempo de cultivo, en particular el tiempo de alimentación semicontinua de 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 alimentación semicontinua de glicerol y/o el tiempo de inducción, preferiblemente el tiempo de inducción, por ejemplo, en el 30-80 %, en

comparación con el tiempo de cultivo y alimentación semicontinua de glicerol o el tiempo de inducción convencionales para el organismo huésped. Tal adaptación puede ser por ejemplo una reducción en el 30 %, el 50 %, el 70 % o el 80 % en comparación con el tiempo de cultivo y alimentación semicontinua de glicerol o el tiempo de inducción convencionales para el organismo huésped. Un ejemplo de un tiempo de inducción adaptado, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, es una disminución del tiempo de inducción desde aproximadamente 96 horas hasta un periodo de entre 24 y 96 horas, en particular hasta 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 alimentación semicontinua de glicerol adaptado, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, es una disminución del tiempo de alimentación semicontinua de glicerol desde aproximadamente 16 hasta 18 horas hasta un periodo de entre 2 y 4 horas.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes relacionadas con el producto, que van a aplicarse solas o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, y/o cualquier otra realización de la invención descrita 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, en de 1 °C a 15 °C, en comparación con la temperatura de cultivo y/o inducción convencional para el organismo huésped. Por ejemplo, la temperatura de cultivo y/o inducción puede disminuirse en 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C o 15 °C. En una realización preferida, la temperatura de cultivo y/o inducción se disminuye en 5 °C, por ejemplo, desde 30 °C hasta 25 °C, o en 10 °C, por ejemplo, desde 30 °C hasta 20 °C. Un ejemplo de una temperatura de inducción adaptada, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*, es una disminución de la temperatura de inducción 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.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción para reducir la formación de variantes carbamyladas relacionadas con el producto, que van a aplicarse solas o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, la temperatura de cultivo y/o inducción adaptada y/o cualquier otra realización descrita 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 disminuir la concentración de oxígeno disuelto, por ejemplo, de 0,3 a 0,8 veces, en comparación con la concentración de oxígeno disuelto convencional para el huésped respectivo. Tal 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 convencional del 30 % para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que van a aplicarse solas o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, la temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, la saturación de oxígeno adaptada y/o cualquier otra realización descrita en el presente documento, es una adaptación de la velocidad y/o composición de alimentación de glicerol. Tal 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 convencional de sustrato complejo en la alimentación de glicerol para el organismo huésped, tal como una disminución desde aproximadamente el 10 % hasta aproximadamente el 5 %, o desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 15 %, hasta aproximadamente el 10 % o hasta aproximadamente el 5 %, para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*. Tal adaptación de la velocidad de alimentación de glicerol puede ser por ejemplo una disminución en la velocidad de alimentación de glicerol en del 30 % al 80 % en comparación con la velocidad de alimentación de glicerol convencional para el huésped respectivo.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que van a aplicarse solas o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, la temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, la saturación de oxígeno adaptada, la velocidad y/o composición de alimentación de glicerol adaptada, y/o cualquier otra realización descrita en el presente documento, es una adaptación de la velocidad y/o composición de alimentación de metanol. Un ejemplo de una velocidad de alimentación de metanol adaptada es una reducción o un aumento en del 30 al 80 %, tal como en el 30 %, el 50 %, el 70 % o el 80 %, en comparación con el protocolo convencional. En una realización específica, la velocidad de alimentación de metanol se reduce hasta 9 ml/l*h o menos, hasta 8 ml/l*h o menos, hasta 7,5 ml/l*h o menos, hasta 7 ml/l*h o menos, hasta 6,5 ml/l*h o menos, hasta 6 ml/l*h o menos, hasta 5 ml/l*h o menos, hasta 4 ml/l*h o menos, hasta 3 ml/l*h o menos, hasta 2 ml/l*h o menos, en comparación con la velocidad de alimentación de metanol convencional para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*.

Una adaptación adicional de las condiciones de cultivo y/o inducción, que van a aplicarse solas o junto con uno o más del pH de cultivo y/o inducción adaptado, el tiempo de cultivo y/o inducción adaptado, la temperatura de cultivo y/o inducción adaptada, la saturación de oxígeno adaptada, la velocidad y/o composición de alimentación de metanol adaptada, la velocidad y/o composición de alimentación de glicerol adaptada, y/o cualquier otra realización descrita en el presente documento, es una adaptación de la composición del medio por ejemplo, mediante el uso 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, el extracto de levadura y/o peptona puede añadirse directamente en el medio de cultivo a una concentración del 0 al 5 % y/o puede añadirse a la alimentación de glicerol y/o metanol en una concentración del 0 al 20 % para un huésped de *Pichia*, en particular *Pichia pastoris*.

Para el procedimiento 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 individuales de inmunoglobulina. Esta variante estructural adicional está formada probablemente por actividad proteolítica. Sin querer restringirse a la teoría, la adición de extracto de levadura y/o peptona puede proporcionar sustratos alternativos para proteasas, de manera que la formación de dominios variables individuales de inmunoglobulina degradados se reduce o se evita en conjunto.

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

Las medidas anteriores, solas o en combinación adecuada, pueden dar como resultado una reducción significativa de variante carbamylada relacionada con el producto tal como se ejemplifica en los ejemplos.

b) Adaptar las condiciones de purificación

Tras la separación del dominio variable individual de inmunoglobulina del huésped, el dominio variable individual de inmunoglobulina puede tratarse de varios modos que disminuyen la formación de aminoácidos carbamylados.

El pH de la disolución de dominio variable individual de inmunoglobulina puede disminuirse. Ejemplos de un pH disminuido son por ejemplo, pH 6,4 o menor, un pH en el intervalo de pH 5 a 6,4, de manera más específica aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 6 o aproximadamente pH 6,4. Dicha disminución del pH también conducirá a la reducción de variantes carbamyladas relacionadas con el producto por sí misma, es decir, sin combinación con temperatura disminuida.

Como alternativa a disminuir el pH y/o además de esta medida, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden someterse a una temperatura disminuida. La disminución de la temperatura con aproximadamente de 5 °C a 10 °C dará como resultado la reducción de la variante carbamylada relacionada con el producto evitando la formación del/de los aminoácido(s) carbamylado(s).

Las medidas anteriores de disminuir el pH y/o disminuir la temperatura pueden combinarse adicionalmente 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 relacionadas con el producto carbamyladas por sí misma, es decir, sin combinación con pH disminuido y/o temperatura disminuida.

Puede apreciarse que las combinaciones de una o más de las medidas de pH disminuido, temperatura disminuida y tampones y/o (co)disolventes libres de cianato potenciarán evitar los aminoácido(s) carbamylado(s) en la variante carbamylada relacionada con el producto, de manera que la variante carbamylada se reduce más rápidamente y/o en un grado mayor.

c) Retirada de variante carbamylada relacionada con el producto mediante cromatografía de intercambio iónico

Las medidas descritas anteriormente, solas o en combinación, se dirigen a reducir la variante carbamylada relacionada con el producto evitando la carbamylación de uno o más residuos de aminoácido.

No obstante, en una realización adicional, que puede usarse sola o en combinación con una o más de las medidas o tratamientos anteriores, la presente invención también se refiere a la retirada de la variante carbamylada relacionada con el producto. En este contexto, retirada significa la separación física del producto deseado, es distinta de la conversión de la variante en el producto deseado evitando la carbamylación de uno o más residuos de aminoácido.

El experto puede utilizar una variedad de técnicas convencionales para retirar la variante carbamylada relacionada con el producto en virtud de cambios en la carga y la hidrofobicidad proteicas en la variante en vista del/de los grupo(s) carbamilo añadido(s). Estos cambios pueden usarse, por ejemplo, para separar la variante carbamylada del producto basándose en un cambio concomitante en el punto isoeléctrico (pI) y en la hidrofobicidad. Pueden usarse técnicas cromatográficas convencionales, que comprenden, pero no se limitan a cromatografía de intercambio iónico (IEX), por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento de 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), para separar la variante carbamylada del producto deseado basándose en un cambio en el punto isoeléctrico observado para la variantes carbamyladas.

La retirada de la variante carbamylada relacionada con el producto mediante separación física del dominio variable individual de inmunoglobulina deseado puede realizarse sola, o en combinación con cualquiera de las otras realizaciones tal como se describe en el presente documento. Ventajosamente, en el caso de una combinación, se realizarán en primer lugar uno o más métodos o tratamientos que reducen la cantidad de variante carbamylada relacionada con el producto evitando la carbamylación de residuos(s) de aminoácido, seguido por una etapa de retirar la variante carbamylada restante mediante separación física.

Dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el método de la invención

La presente solicitud también describe el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante los métodos de la invención tal 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 de aminoácido carbamylado, en particular que comprende al menos un grupo carbamylamino. Por ejemplo, el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención comprende el 0-5 %, más preferiblemente el 0-4 %, el 0-3 %, el 0-2 % o el 0-1 % de variante carbamylada relacionada con el producto. Lo más preferiblemente, el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el método de la presente invención estará libre de la variante carbamylada relacionada con el producto. El experto puede determinar fácilmente la proporción de variante carbamylada relacionada con el producto (como un % del total) por ejemplo, mediante RP-HPLC, cIEF o CL-EM tal como se describe en el presente documento.

En otras palabras, el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención se caracteriza por una homogeneidad estructural mejorada en comparación con las preparaciones de la técnica anterior. En particular, las preparaciones de la técnica anterior pueden comprender el 5-15 %, o incluso proporciones mayores de variante carbamylada relacionada con el producto.

En vista de la homogeneidad estructural mejorada, el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el método de la presente invención es ventajoso en comparación con las preparaciones de la técnica anterior. Por ejemplo, el dominio variable individual de inmunoglobulina de la presente invención es ventajoso para aplicaciones terapéuticas. En relación con el uso terapéutico del anticuerpo, la homogeneidad estructural es de la mayor importancia clínica y reguladora.

Por consiguiente, la presente solicitud también describe preparaciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden el dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención. La presente solicitud también describe el uso médico del dominio variable individual de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el método de la presente invención.

El experto puede formular fácilmente formulaciones farmacéuticamente adecuadas basándose en el conocimiento general común. Además, las referencias que abordan específicamente los dominios variables individuales de inmunoglobulina, que se citan en el presente documento, se refieren explícitamente a ellas. Sin limitación, pueden prepararse formulaciones para vías de aplicación convencionales, incluyendo formulaciones para aplicación nasal, oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravaginal, rectal, aplicación tópica o aplicación mediante inhalación.

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

Ejemplos

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

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

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

Tal como se indica en la tabla 1, se sometieron a prueba varias condiciones de fermentación para determinar la expresión de Nanobody A en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

El Nanobody A (también denominado en el presente documento "NbA") se ha descrito anteriormente en la solicitud de patente WO2010/115998 y es un Nanobody biespecifico bivalente que consiste en dos dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada, del que una subunidad ha madurado por afinidad y es específica para unirse al antígeno A1 (denominada a continuación en el presente documento NbA1) mientras que las subunidades restantes se unen a albúmina sérica humana (denominada en el presente documento NbA2). Las subunidades se fusionan cabeza con cola con un ligador de glicina-serina de 9 aminoácidos (9GS) en el formato siguiente: NbA1 - 9GS - NbA2 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 1):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSVFKINVMAWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYAD
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTVTVSSG
 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
 SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSSQGLTVTVSS

Normalmente se realizaron alimentaciones semicontinuas de glicerol de *Pichia* en medio rico y se inició la inducción mediante la adición de metanol. Se variaron las condiciones de cultivo en lo que se refiere a pH, temperatura, velocidad de alimentación de metanol, pO₂ (concentración de oxígeno disuelto) y composición del medio (tabla 1).

Tabla 1. Resumen de diferentes condiciones de fermentación sometidas a prueba para determinar la expresión de Nanobody A en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y % de área de picos posteriores correspondientes a la variante relacionada con Nanobody As con diferencia de masa de -18 Da y +43 Da (NbA -18 Da y NbA +43 Da) observados en cromatogramas de RP-HPLC obtenidos a partir de muestras de caldo clarificadas tomadas durante la fase inicial de la expresión (punto de tiempo 1, desde 15 hasta 35 horas tras el inicio de la inducción) y en la recogida (punto de tiempo 2, desde 80 hasta 160 horas tras la inducción) durante la fermentación de Nanobody A (hai: horas tras la inducción; WCW: peso celular húmedo; *: % de área de 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 de pico posterior correspondiente a NbA -18 Da y NbA +43 Da en el punto de tiempo:	
		1	2
015	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l pH = 7,0 Temperatura = 20 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 30 % + alimentación compleja durante la alimentación de MeOH	17,20 hai 7,3 %	82,60 hai 15,3 %
017	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l pH = 7,0 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 10 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 15 % + alimentación compleja durante la alimentación de MeOH	17,20 hai 11,4 %	82,60 hai 30,7 % + 8,3 %*
023	Inducción en WCW de aproximadamente 460 g/l pH = 6,5 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 40 %	32 hai 4,8 %	144,50 hai 6,9 %
024	Inducción en WCW de aproximadamente 350 g/l pH = 6,5 Temperatura = 25 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 8 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 22,5 %	17,10 hai 6,9 %	155 hai 5,4 %
025	Inducción en WCW de aproximadamente 200 g/l pH = 6,5 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 5 %	18,23 hai 4,3 %	162,23 hai 8,5 %
030	Inducción en WCW de aproximadamente 450 g/l pH = 6,5 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial pO ₂ = 40 %	24,50 hai 3,7 %	98,20 hai 5,1 %

032	Inducción en WCW de aproximadamente 460 g/l pH = 6,0 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 4,7 ml/h/l de volumen inicial pO2 = 30 %	19 hai 3,4 %	92,70 hai 4 %
027	Inducción en WCW de aproximadamente 440 g/l pH = 5,5 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 8 ml/h/l de volumen inicial pO2 = 5 %	32 hai 3,0 %	144,50 hai 3,5 %
018	Inducción en WCW de aproximadamente 380 g/l pH = 5,0 Temperatura = 30 °C Velocidad de alimentación de MeOH = 3 ml/h/l de volumen inicial + alimentación compleja durante la alimentación de MeOH pO2 = 30 %	17,20 hai 4,1 %	82,60 hai 4,8 %

Se realizó control en proceso (IPC) en muestras de caldo clarificadas que se tomaron en diferentes puntos de tiempo durante la fermentación con el fin de determinar el título del producto y de evaluar la presencia de variantes relacionadas con el producto.

5 La primera etapa en el protocolo de 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 los componentes del medio con el fin de obtener alta resolución durante la segunda etapa en el protocolo, es decir, el 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 μm; Agilent, N.º de parte 883995-906).

15 Entonces se determinaron las cantidades relativas de producto y variantes relacionadas con el producto midiendo la absorbancia de luz de los componentes que eluían de la columna de RP-HPLC. La cantidad relativa de una variante proteica específica, expresada como el % de área, se calculó dividiendo el área de pico correspondiente a la variante entre el área integrada total (área relevante).

20 Los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos a partir de muestras de IPC tomadas en la fase de expresión inicial (punto de tiempo 1) y en la recogida (punto de tiempo 2) de Nanobody A mostraron un pico posterior con tiempo de retención relativo (T_{RR}) de 1,06.

25 El producto correspondiente a este pico posterior mostró una diferencia de masa de -18 Da con Nanobody A (denominado en el presente documento "NbA -18 Da") lo que indica que es una variante de piroglutamato de Nanobody A, cuya formación da como resultado pérdida de agua tras la ciclación del ácido glutámico N-terminal de Nanobody A.

30 En la figura 1 se muestran cromatogramas de RP-HPLC representativos de fermentaciones realizadas a pH 6 y menor: esta figura muestra cromatogramas obtenidos a partir de muestras de IPC tomadas a las 19 hai (figura 1A) y 92,70 hai (figura 1B) en la condición de fermentación número 032 en la tabla 1, indicando el pico posterior correspondiente a NbA -18 Da.

Este pico posterior fue similar en todas las condiciones de fermentación sometidas a prueba, lo que indica que la formación de esta variante no se correlacionó con las condiciones sometidas a prueba (tabla 1).

35 Sorprendentemente, en todas las fermentaciones realizadas a pH 6,5 y mayor, se observó un pico posterior adicional con T_{RR} de 1,04.

40 Este pico posterior se solapa en gran medida con el pico posterior de NbA -18 Da y se encontró que tenía una diferencia de masa de +43 Da con Nanobody A (denominado en el presente documento "NbA +43 Da") lo que sugiere la posibilidad de carbamilación de Nanobody A.

Además, en una configuración de fermentación particular (número 017 en la tabla 1) estaba presente un pico posterior adicional con T_{RR} de 1,07 en la muestra al final de la fermentación.

45 El pico posterior adicional se identificó mediante espectrometría de masas como Nanobody A con dos masas adicionales de +43 Da (denominadas en el presente documento "NbA + 2 × 43 Da"), lo que sugiere la posibilidad de una variante relacionada con Nanobody A que está carbamilada en dos sitios diferentes.

50 La figura 2 muestra cromatogramas obtenidos a partir de muestras de IPC tomadas a las 17,20 hai (figura 2A) y las 82,60 hai (figura 2B) en la condición de fermentación número 017 en la tabla 1, lo que indica los picos posteriores de

solapamiento con T_{RR} de 1,06 y 1,04 correspondientes a NbA -18 Da y NbA +43 Da, respectivamente, y el pico posterior con T_{RR} de 1,07 correspondiente a NbA + 2 × 43 Da.

5 Se observó que el pico posterior de NbA +43 Da ya estaba presente en las fases de expresión iniciales y que este pico posterior aumentaba en función del tiempo de inducción prácticamente en todas las condiciones de fermentación sometidas a prueba (tabla 1 y figura 2). Sin embargo, este aumento dependiente del tiempo observado del pico posterior de NbA +43 Da fue más pronunciado a niveles de pH superiores (tabla 1).

10 Ejemplo 2: Identificación del sitio de carbamilación en Nanobody A

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

15 Para comprobar la posibilidad de carbamilación y para identificar el/los sitio(s) carbamilación en Nanobody A, se analizó la muestra de IPC procedente del fermentador 017 a las 82,6 hai (muestra de recogida purificada usando cromatografía con proteína A) a través de mapeo de péptidos. Esta muestra se denominó Nanobody A-017CV. Esta muestra también se usó en experimentos descritos en las secciones siguientes.

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

25 Los datos de la espectrometría de masas (EM) se procesaron usando el software BiopharmaLynx™ (Waters). Se localizó una masa adicional de +43 Da en el péptido N-terminal (péptido T1). Aunque las mediciones de masa total indicaron la aparición de carbamilación en dos sitios diferentes, no pudieron identificarse péptidos adicionales con una masa de +43 Da con el método usado.

30 Para determinar el sitio de carbamilación exacto, se realizó cromatografía de líquidos – espectrometría de masas en tándem (CL/EMEM) en el péptido T1 +43 Da usando dos métodos de fragmentación diferentes, es decir, con baja y alta energía de colisión. Usando este último método, se demostró claramente en la serie de iones b que +43 Da estaba localizado en el residuo de ácido glutámico (E) N-terminal. Este resultado mostró que la reacción de carbamilación se producía predominantemente en el extremo amino terminal de Nanobody A.

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

El Nanobody A se une tanto a la diana A y como a la albúmina sérica humana (HSA). Estas dos funcionalidades pueden someterse a prueba mediante:

40 1) Un método de Biacore para la unión a la diana A o a HSA que permite un examen rápido de la funcionalidad de unión de Nanobody A a sus dianas respectivas. Se usaron comparaciones de las pendientes de la unión para la comparación relativa.

2) Dos ensayos de potencia basados en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) diferentes para monitorizar las potencias relativas para la diana A y HSA.

45 Se analizó la muestra carbamilada Nanobody A-017CV usando Biacore y los ensayos de potencia para verificar si la carbamilación podría afectar a la potencia. Esta muestra estaba carbamilada en el 30,7 % en el extremo N-terminal y estaba carbamilada en el 8,3 % en un sitio adicional, lo más probablemente un residuo de lisina o arginina. Esta muestra también contenía un 10 % de fragmentos de degradación proteolítica, por tanto podría esperarse una potencia máxima del 90-100 %.

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

55 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 carbamilado-017CV en comparación con el Nanobody A de referencia (tabla 2). Esta aparente pérdida de actividad también se observó durante el análisis de Biacore en HSA inmovilizada (tabla 3), donde se demostró una actividad restante del 78,1 %.

60 Tabla 2. Resultados de Biacore que muestran el % de unión de Nanobody A carbamilado a la diana A en relación con material de referencia no carbamilado.

Nanobody A	Pendiente (RU/s)	Funcionalidad comparada con la referencia (%)
Referencia	0,581	77,6
NbA-017 CV 5 nM	0,451	

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

Nanobody A	Pendiente promedio (RU/s)	Funcionalidad comparada con la referencia (%)
Referencia	3,99	78,1 (78,07-78,13)
NbA-017 CV 5 nM	3,1	

Como no se esperaba que la carbamilación en el residuo N-terminal tuviera un impacto sobre las funcionalidades de unión a la diana A y a HSA de Nanobody A, la pérdida en la actividad se atribuyó lo más probablemente a la carbamilación de un residuo de lisina o arginina en la secuencia de Nanobody A.

Ensayos basados en ELISA para determinar la potencia de Nanobody A carbamylado en relación con un lote de referencia

El ensayo ELISA de potencia para la unión de la diana A fue un ensayo de tipo de neutralización: Nanobody A inhibe la interacción entre el ligando de la diana A y la diana A (un receptor), impidiendo de ese modo la señalización del receptor. Brevemente, se preincubó una mezcla del 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 unía a la misma diana A que tenía la siguiente secuencia(SEQ ID NO: 2):

EVQLVESGGGFVQAGGSLRLSCIASGDNFSINRMGWYRQALGKQRELVAIITNHGSTNYADAVKGRFT
ISRDIYAKNTVYLQMNGLKPDDTAVYYCNAYISEVGTWRDDYWGQGIQVTVSS

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

El ELISA desarrollado para la unión de HSA se basó en la unión directa de Nanobody A a HSA recubierto sobre la plata. Se detectó cualquier Nanobody A unido usando un anticuerpo anti-Nanobody-Nanobody acoplado directamente a HRP (peroxidasa del rábano) y una detección colorimétrica, respectivamente.

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

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

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

	Diana A	
	Lote de control	Nanobody A-017CV
Paralelismo (límites equiv.)	PASADO	PASADO
Resultados atípicos	0	0
Potencia relativa	1,020	0,657
IC, límite inferior	0,963	0,619
IC, límite superior	1,076	0,694
% de IC	11,0 %	11,4 %
	HSA	
	Lote de control	Nanobody A-017CV
Paralelismo (límites equiv.)	PASADO	PASADO
Resultados atípicos	0	0
Potencia relativa	1,052	0,724
IC, límite inferior	0,956	0,660
IC, límite superior	1,148	0,788
% de IC	18,2 %	17,6 %

Ejemplo 4: La variante carbamylada puede retirarse mediante cromatografía de intercambio iónico

Resulta interesante que el análisis mediante isoelectroenfoque (cIEF) por capilaridad de Nanobody A-017CV de muestra, que contiene una y dos veces el Nanobody A carbamylado, dio como resultado dos picos previos adicionales en el electroferograma en comparación con la muestra de referencia no carbamylada (figura 3). El % del área de superficie total de estos picos (± 40 %) se corresponde muy bien con el % de área de los picos posteriores observados durante RP-HPLC ($30,7$ % + $8,3$ % = 39 %). Por tanto, estos picos representan lo más probablemente las variantes carbamyladas, que tienen aparentemente un pI que es significativamente menor que el del producto no carbamylado (pI 9,7).

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

La diferencia de pI significativa entre Nanobody A carbamylado y no carbamylado implica que la(s) variante(s) carbamyladas pueden retirarse del material intacto usando cromatografía de intercambio iónico.

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

El análisis de RP-HPLC de la muestra antes de la purificación, que se tomó en el momento de la recogida del fermentador y que se purificó parcialmente usando cromatografía con proteína A, mostró la presencia de un gran pico posterior. El análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetro de masas (CL-EM) confirmó que los productos correspondientes a este pico posterior mostraron una diferencia de masa de -18 Da y +43 Da con Nanobody A indicando que eran el piroglutamato y la variante carbamylada de Nanobody A descrita anteriormente (figura 5A) y que este pico posterior correspondía con el pico posterior con T_{RR} de 1,04 que solapaba con el pico posterior con T_{RR} de 1,06 tal como se describió anteriormente.

Y lo que es más importante, Nanobody A carbamylado ya no pudo detectarse mediante EM en el lote purificado final (figura 5B), lo que sugiere que la variante carbamylada se retiró durante el procesamiento posterior. Esto coincide 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 tras la recogida.

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 (correspondientes respectivamente a NbA -18 Da y NbA +43 Da (pico posterior 1) y NbA + 2 × 43 Da (pico posterior 2) tal como se describió anteriormente) ha disminuido claramente tras esta etapa en comparación con la etapa de procesamiento anterior. El hecho de que la variante carbamylada pueda separarse del material intacto usando cromatografía de intercambio iónico coincide con las diferencias de pI observadas entre Nanobody A intacto y carbamylado (figura 3).

Ejemplo 5: La carbamylación *in vitro* (carbamylación forzada) de Nanobody A se produce predominantemente en el aminoácido N-terminal

Puede inducirse carbamylación *in vitro* incubando la proteína en urea. La urea en disolución está en equilibrio con cianato de amonio. La forma en que reacciona con grupos amino de proteína es ácido isocianico. La reacción de carbamylación puede acelerarse en disoluciones de urea descompuesta (por ejemplo, tras calentamiento; Stark *et al.*, 1960, J. Biol. Chem. 235, 3177-3181).

Se incubó Nanobody A 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 solapa con el pico de piroglutamato (figura 7). El % de área de este pico aumentó con el aumento de 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 solapa con el de los picos observados en la muestra de IPC Nanobody A-017CV (véase la figura 2) que se identificaron como variantes carbamyladas (reacción de carbamylación *in vivo*).

Se realizó análisis mediante CL-EM y mapeo de péptidos en la muestra tratada con la disolución de urea 1 M y se confirmó la aparición de carbamylación. El mapeo de péptidos demostró que aproximadamente el 13 % del péptido T1 N-terminal contenía la masa adicional de +43 Da. En conclusión, se produce carbamylación tanto *in vivo* como *in vitro* carbamylación predominantemente en el aminoácido N-terminal.

En los ejemplos siguientes 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 carbamylado.

Ejemplo 6: Observaciones de una variante similar en Nanobody B expresado en *Pichia pastoris*

El Nanobody B (también denominado a continuación en el presente documento "NbB") se ha descrito en la solicitud PCT/EP2011/060738 que reivindica prioridad sobre el US 61/358,495 (publicado como WO2011/161266 el 29-12-2011) y es un Nanobody biparatópico que consiste en dos dominios variables individuales de inmunoglobulina con

secuencias optimizadas de anticuerpo de llama de cadena pesada, del que una subunidad es específica para la unión a un primer epítipo en el antígeno B (denominada a continuación en el presente documento NbB1) y otra subunidad es para la unión a un segundo epítipo en el antígeno B (denominada a continuación en el presente documento NbB2). Las subunidades se fusionan cabeza con cola con un ligador de glicina-serina de veinte aminoácidos (20GS) en el formato siguiente: NbB1 - 20GS - NbB2 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 3):

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIKSSGDSTRYAGSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAKSRVSRRTGLYTYDNRGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNMYAMGWFRQAPGKEREFVAAITRSGVRSVSA
IYGDSVKDRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSGQGLVTVSS
```

10 Tal como se indica en la tabla 5, se sometieron a prueba varias condiciones de inducción para determinar la expresión de Nanobody B en la cepa X33 de *Pichia pastoris*. Normalmente se realizaron alimentaciones semicontinuas de 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 comenzó cuando el peso celular húmedo alcanzó 400 ± 20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol.

15 Se usaron diferentes velocidades de alimentación de metanol (tabla 5). Al comienzo 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 a su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de referencia (aumento de 1 unidad de pH por hora).

20 Tabla 5: Resumen de diferentes condiciones de inducción (en lo que se refiere a pH, temperatura (t°) y velocidad de alimentación de metanol (MeOH) durante la inducción) sometidas a prueba para determinar la expresión de Nanobody B en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y % 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)	Velocidad de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de área de 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
10	6,05	30	11	0
3	6,5	22	11	2,0
4	6,5	30	4	2,3

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

30 Se llevaron a cabo experimentos de RP-HPLC en una columna Zorbax 300SB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 μ m; Agilent, N.º de parte 883995-906).

35 La figura 8 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos a partir de muestras de cultivo libres de células purificadas mediante CEX tomados 96 horas tras 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 continua; condición 6 en la tabla 5).

De manera correspondiente con las observaciones para Nanobody A, la fermentación realizada a pH 6,5 condujo a un pico posterior aumentado con un tiempo de retención relativo (T_{RR}) de 1,05 (figura 8).

40 Un análisis de CL-EM realizado en estas muestras indicó la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.

45 Con el fin de obtener confirmación adicional de la identidad de las especies que se forman durante la fermentación a pH superior, se realizó un experimento de carbamilación forzada en Nanobody B purificado. Brevemente, se incubó Nanobody B 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, se analizó la muestra mediante RP-HPLC y espectrometría de masas (véase la figura 9).

5 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 con el pico posterior observado en muestras fermentadas a pH 6,5 (figura 8). El análisis de EM de estos picos posteriores confirmó la presencia de formas monocarbamiladas de Nanobody B.

La producción de formas carbamiladas aumentó haciendo funcionar la fermentación a un pH superior (6,5); a un pH inferior (véase la tabla 5) no se detectaron derivados carbamilados.

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

15 El Nanobody C (también denominado a continuación en el presente documento "NbC") se ha descrito anteriormente en la solicitud de patente WO/2010/139808 y es un Nanobody trivalente que consiste en tres dominios variables individuales de inmunoglobulina de un anticuerpo de llama de cadena pesada, del que tres subunidades son específicas para la unión al mismo epítipo en el antígeno C (denominadas a continuación en el presente documento NbC1). Las subunidades se fusionan cabeza con cola con un ligador de glicina-serina de quince aminoácidos (15GS) en el formato siguiente: NbC1^{E1D}-15GS-NbC1-15GS-NbC1 (es decir, las tres subunidades tienen la misma secuencia aparte del ácido glutámico (E) N-terminal en la primera subunidad que se ha cambiado por un ácido aspártico (D) para reducir la formación de piroglutamato en el extremo amino-terminal) y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 4):

DVQLVESGGGLVQAGGSLSI SCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRF
TISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLSI SCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPN
VEGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGGS
GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLSI SCAASGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDIT
IGPPNVEGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS

25 Tal como se indica en la tabla 6, se sometieron a prueba varias condiciones de fermentación para determinar la expresión de Nanobody C en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

30 Normalmente se realizaron alimentaciones semicontinuas de 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 comenzó cuando el peso celular húmedo alcanzó 400 ± 20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol. Se usaron diferentes velocidades de alimentación de MeOH (tabla 6). Al comienzo 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 a su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de referencia (aumento de 1 unidad de pH por hora).

35 Tabla 6: Resumen de diferentes condiciones de inducción (en lo que se refiere a pH, temperatura (t°), velocidad de alimentación de metanol (MeOH) y composición del medio (porcentaje de sustrato complejo en la alimentación de glicerol durante la inducción) sometidas a prueba para determinar la expresión de Nanobody C en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y % de área del pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody C con diferencia de masa de +43 Da (NbB +43 Da) observada en cromatogramas de RP-HPLC

N.º	pH	t° (°C)	Velocidad de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de sustrato complejo en la alimentación de glicerol	% de área de pico posterior correspondiente a la variante relacionada con Nanobody C con una diferencia de masa de +43 Da		
					a las 96 hai	a las 120 hai	a las 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	7	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	-

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

5 Se llevaron a cabo experimentos de RP-HPLC en una columna Zorbax 300SB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 µm; Agilent, N.º de parte 883995-906).

10 La figura 10 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos a partir de muestras de cultivo libres de células purificadas a través de cromatografía de modo mixto tomadas 118 horas tras la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody C a pH 7 (línea discontinua) y pH 6,4 (línea continua).

15 De manera correspondiente con las observaciones para Nanobody A y Nanobody B, un pH de inducción superior condujo a un pico posterior aumentado con un tiempo de retención relativo (T_{RR}) de 1,04 (compárese por ejemplo con las condiciones de fermentación número 008 y 017 en la tabla 6; figura 10). Un análisis de CL-EM realizado en estas muestras demostró la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.

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

25 Con el fin de obtener confirmación adicional de la identidad de las especies que se forman durante la fermentación a pH superior, se realizó un experimento de carbamilación forzada en Nanobody C purificado. Brevemente, se incubó Nanobody C 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, se analizó la muestra mediante CL-EM (véase la figura 11).

30 El perfil cromatográfico de la muestra de Nanobody C tratada con urea es comparable (al igual que el T_{RR} de los picos posteriores) con el mostrado en la figura 10 en relación con una muestra de fermentación a pH 7,0; el análisis de EM en el pico posterior confirmó la presencia de formas mono y bicarbamiladas de Nanobody C.

35 La producción de formas carbamiladas de Nanobody C aumenta haciendo funcionar la fermentación a un pH superior (7,0); a un pH inferior, tal como 6,4, los derivados carbamilados apenas son detectables.

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

40 El Nanobody D (también denominado a continuación en el presente documento "NbD") se ha descrito anteriormente en la solicitud de patente WO 2011/073180 y es un Nanobody trivalente que consiste en tres dominios variables individuales de inmunoglobulina de un anticuerpo de llama de cadena pesada, del que las dos subunidades son específicas para la unión al mismo epítipo en el antígeno D (denominadas a continuación en el presente documento NbD1) mientras que la subunidad restante se une a albúmina sérica humana (denominada a continuación en el presente documento NbD2). Las subunidades se fusionan cabeza con cola con un ligador de glicina-serina de 9 aminoácidos (9GS) en el formato siguiente: NbD1 - 9GS - NbD2- 9GS - NbD1 y que tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 5):

45

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFT
 ISIDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG
 LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTT
 LYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
 AASRSIGRLDRMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMNLSRPEDT
 AVYYCNFNKYVTSRDTWGQGLTVTVSS

Tal como se indica en la tabla 7, se sometieron a prueba varias condiciones de fermentación para determinar la expresión de Nanobody D en la cepa X33 de *Pichia pastoris*.

5 Normalmente se realizaron alimentaciones semicontinuas de 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 comenzó cuando el peso celular húmedo alcanzó 400 ± 20 g/l. La inducción se inició mediante la adición de metanol. Se usaron diferentes velocidades de alimentación de MeOH (tabla 7). Al comienzo 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 a su nuevo valor mediante un aumento lineal hasta el nuevo punto de referencia (aumento de 1 unidad de pH por hora).

15 Tabla 7: Resumen de diferentes condiciones de inducción (en lo que se refiere a pH, temperatura (t°) y velocidad de alimentación de MeOH durante la inducción) sometidas a prueba para determinar la expresión de Nanobody D en la cepa X33 de *Pichia pastoris* y % 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 cromatogramas de RP-HPLC

N.º	pH de inducción	t° de inducción (°C)	Velocidad de alimentación de MeOH (ml/h/l)	% de área de pico posterior correspondiente a 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
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

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

25 Se llevaron a cabo experimentos de RP-HPLC en una columna Acclaim 300 C18 (4,6 × 150 mm, 3 µm; Dionex, N.º de parte 060266).

30 La figura 12 muestra los cromatogramas de RP-HPLC obtenidos a partir de muestras de cultivo libres de células purificadas con proteína A tomadas 96 horas tras la inducción (hai) durante la fermentación de Nanobody D a pH 7 (condición 6) y pH 6,25 (condición 9).

35 De manera correspondiente con las observaciones para Nanobody A, B y C, un pH de inducción superior condujo a un pico posterior aumentado con un tiempo de retención relativo (T_{RR}) de 1,03 (compárese por ejemplo con las condiciones de fermentación número 6 y 12 o 7 y 4 en la tabla 7; figura 11). Un análisis de CL-EM realizado en estas muestras demostró la presencia de una variante carbamilada (+43 Da) en esta región.

Además, se observó que el pico posterior de NbD +43 Da aumentó con el aumento de la temperatura de inducción (compárese por ejemplo con las condiciones de fermentación número 1 y 6 en la tabla 7).

40 A menos que se indique otra cosa, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como quedará

claro para el experto. Por ejemplo, se hace referencia de nuevo a manuales convencionales y a la técnica anterior general mencionada en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en ellos; así como por ejemplo a las revisiones siguientes 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, 248(1-2), 31-45; Schmitz *et al.*, *Placenta*, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, *Tumour Biol.*, 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para la obtención de proteínas mediante ingeniería genética, tal como maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

Lista de secuencias

- 10 <110> Ablynx N.V.
- <120> Método para la producción de dominios variables individuales de inmunoglobulina
- <130> P10-016-PCT-1
- <160> 5
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 245
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de Nanobody
- 25 <400> 1

ES 2 660 895 T3

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

ES 2 660 895 T3

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
 180 185 190

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
 195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 2

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de Nanobody

10

<400> 2

ES 2 660 895 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Asp Asn Phe Ser Ile Asn
 20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Thr Asn His Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ala Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Tyr Ile Ser Glu Val Gly Thr Trp Arg Asp Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 270

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de Nanobody

10

<400> 3

ES 2 660 895 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Lys Ser Ser Gly Asp Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Arg Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Thr Tyr Asp Asn Arg
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 130 135 140
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met
 165 170 175
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
 180 185 190
 Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp
 195 200 205
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 210 215 220

ES 2 660 895 T3

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu
245 250 255

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 4

<211> 408

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de Nanobody

10

<400> 4

ES 2 660 895 T3

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

ES 2 660 895 T3

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
 180 185 190
 Asn Trp Arg Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg
 195 200 205
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met
 210 215 220
 Asn Ser Leu Ala Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Pro Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 275 280 285
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ile Ser Cys
 290 295 300
 Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr Val Leu Gly Trp Phe Arg
 305 310 315 320
 Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Trp Arg
 325 330 335
 Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile
 340 345 350
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 355 360 365
 Ala Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly Thr Pro Leu
 370 375 380
 Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg
 385 390 395 400
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 405

<210> 5
<211> 367
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de Nanobody

10

<400> 5

ES 2 660 895 T3

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
 20 25 30
 Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 115 120 125
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 130 135 140
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 145 150 155 160
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 165 170 175
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 180 185 190
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 195 200 205
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 210 215 220
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240

ES 2 660 895 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 245 250 255

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 260 265 270

Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg
 275 280 285

His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly
 290 295 300

Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 305 310 315 320

Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 325 330 335

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr
 340 345 350

Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 355 360 365

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir un dominio variable individual de inmunoglobulina en *Pichia pastoris* que comprende al menos las etapas de cultivar *P. pastoris* para producir el dominio variable individual de inmunoglobulina que comprende:
- 10 i) cultivar *P. pastoris* en condiciones que son de manera que *P. pastoris* se multiplicará;
- ii) mantener *P. pastoris* en condiciones que son de manera que *P. pastoris* expresa y/o produce el dominio variable individual de inmunoglobulina;
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que los dominios variables individuales de inmunoglobulina que comprenden uno o más residuos de aminoácido carbamidados se retiran mediante una o más técnicas cromatográficas.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que las técnicas cromatográficas son técnicas cromatográficas basadas en cambios en el pI o la hidrofobicidad, lo más preferiblemente cromatografía de intercambio iónico.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina es una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o una secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada.
- 30 5. Método según la reivindicación 4, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina es un VHH, un VHH humanizado, o un VH camelizado.

Figura 1

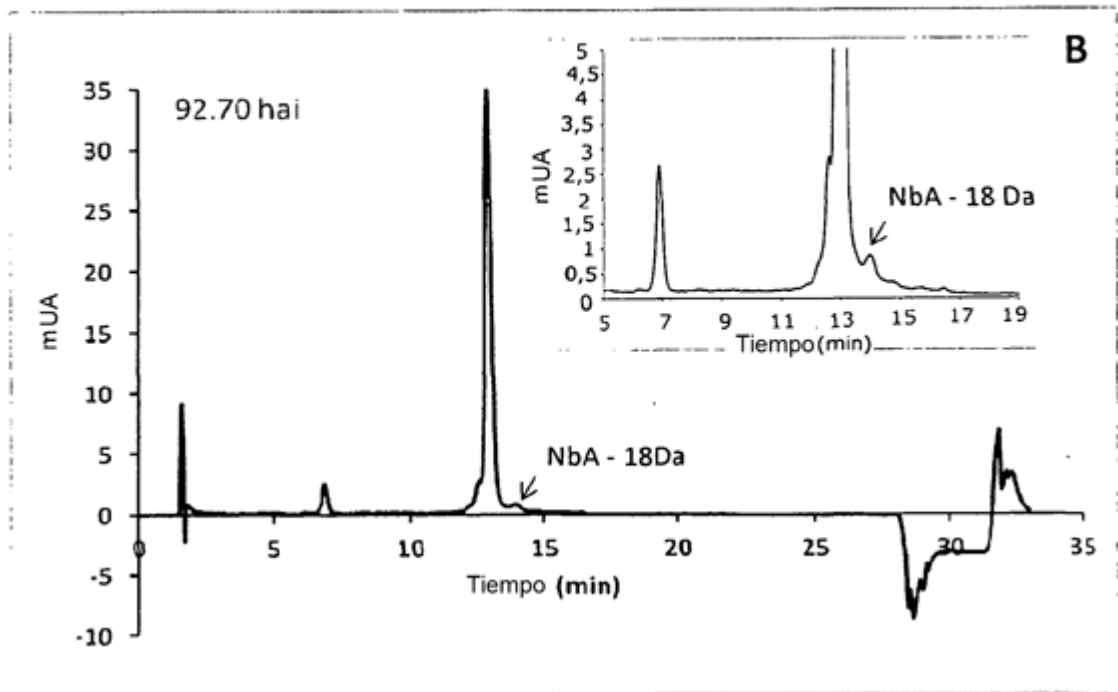
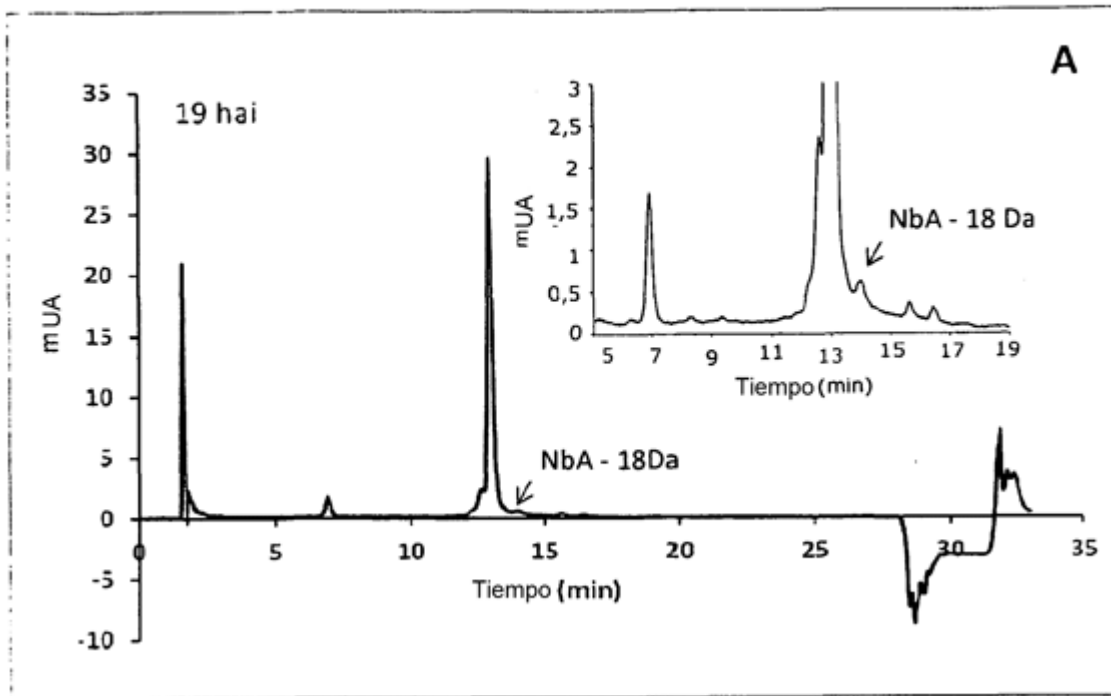


Figura 2

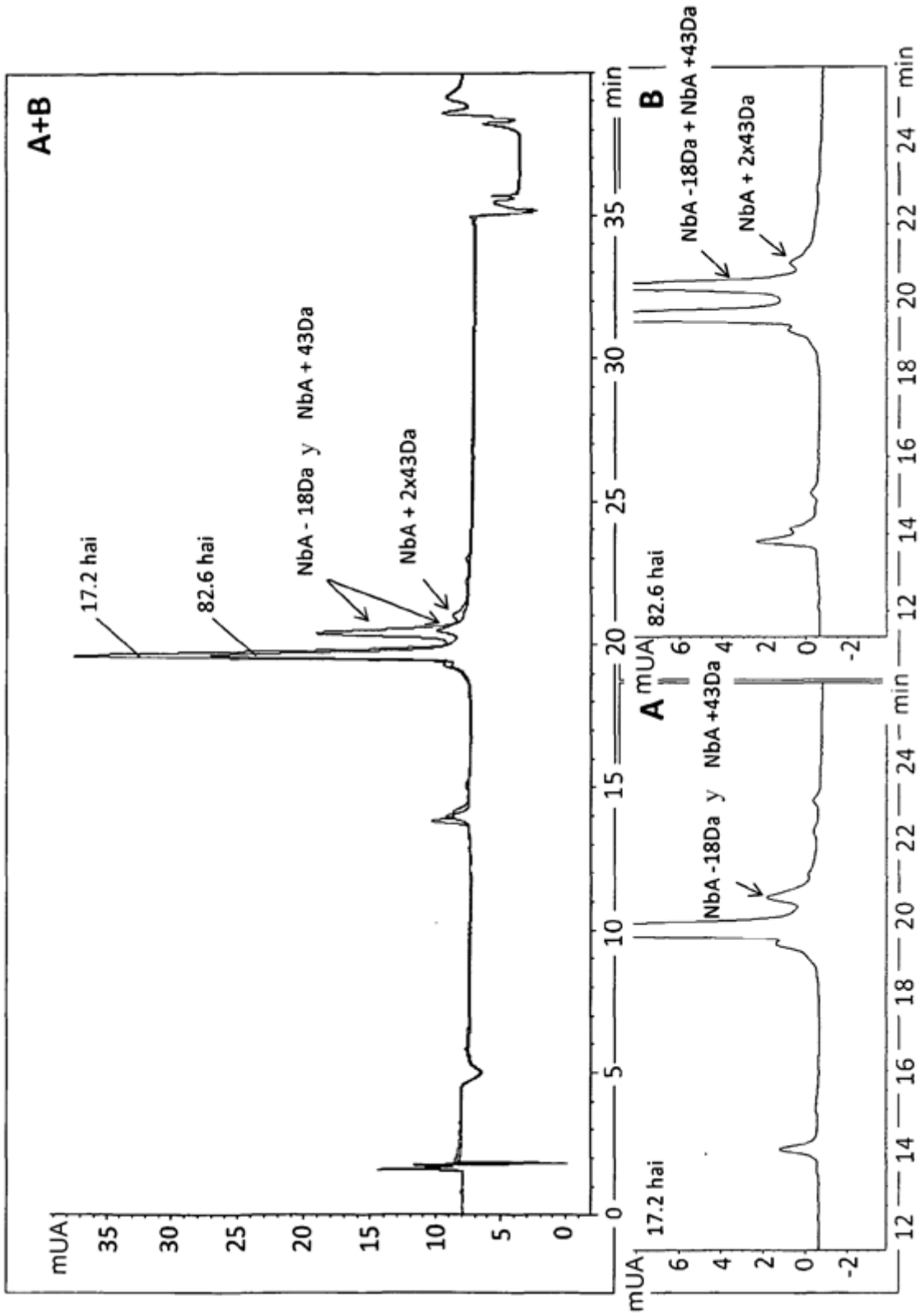


Figura 3

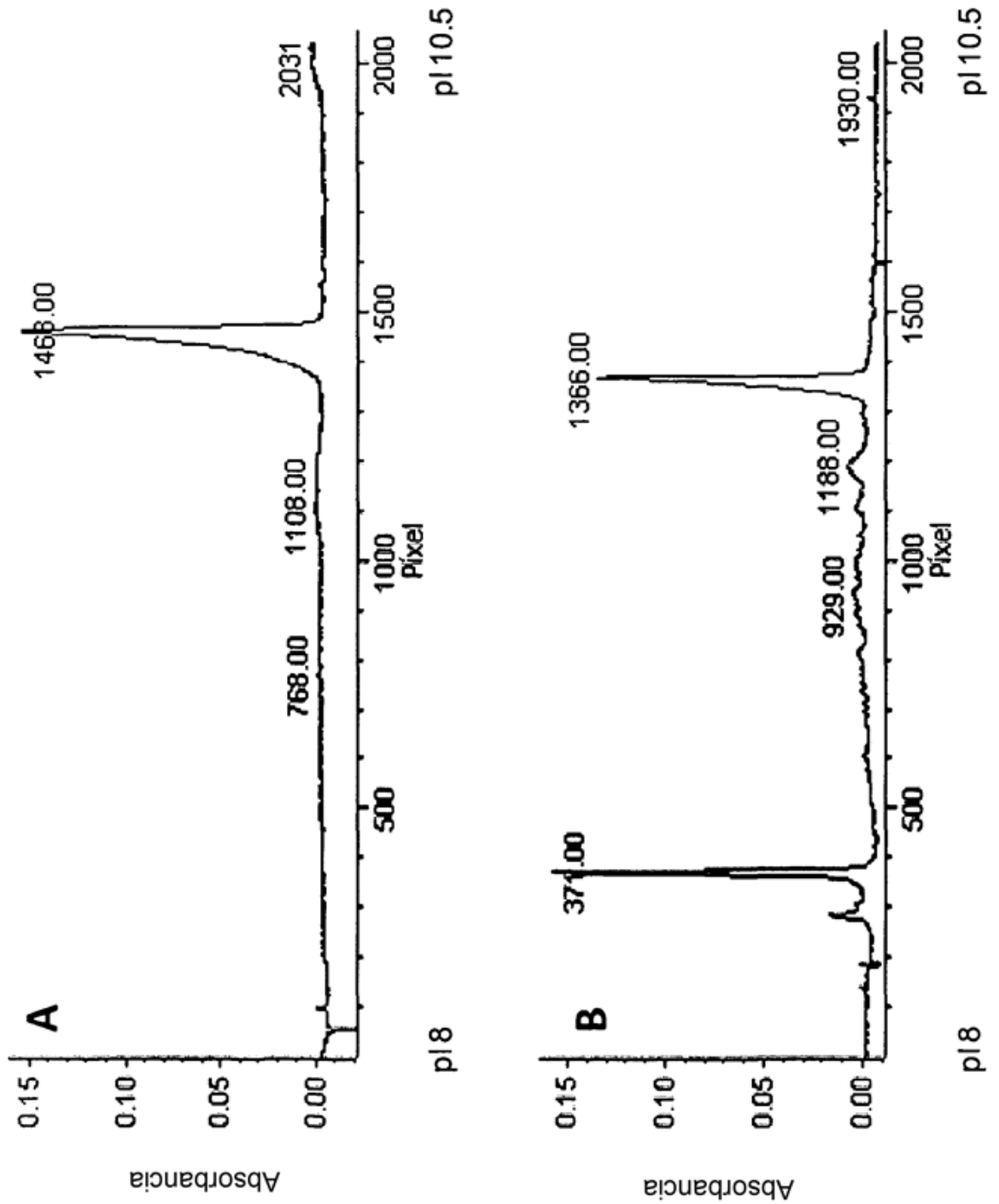


Figura 4

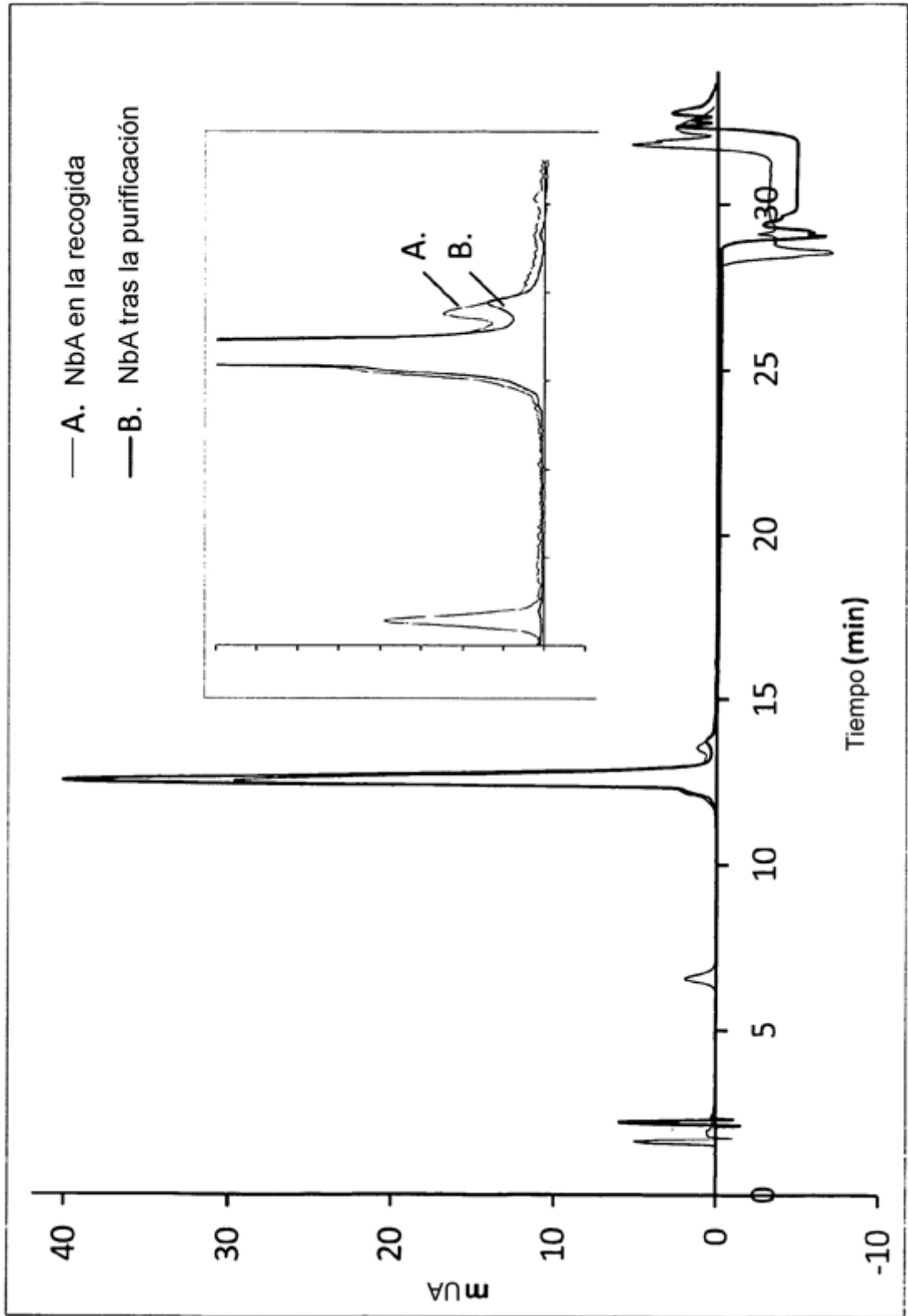


Figura 5

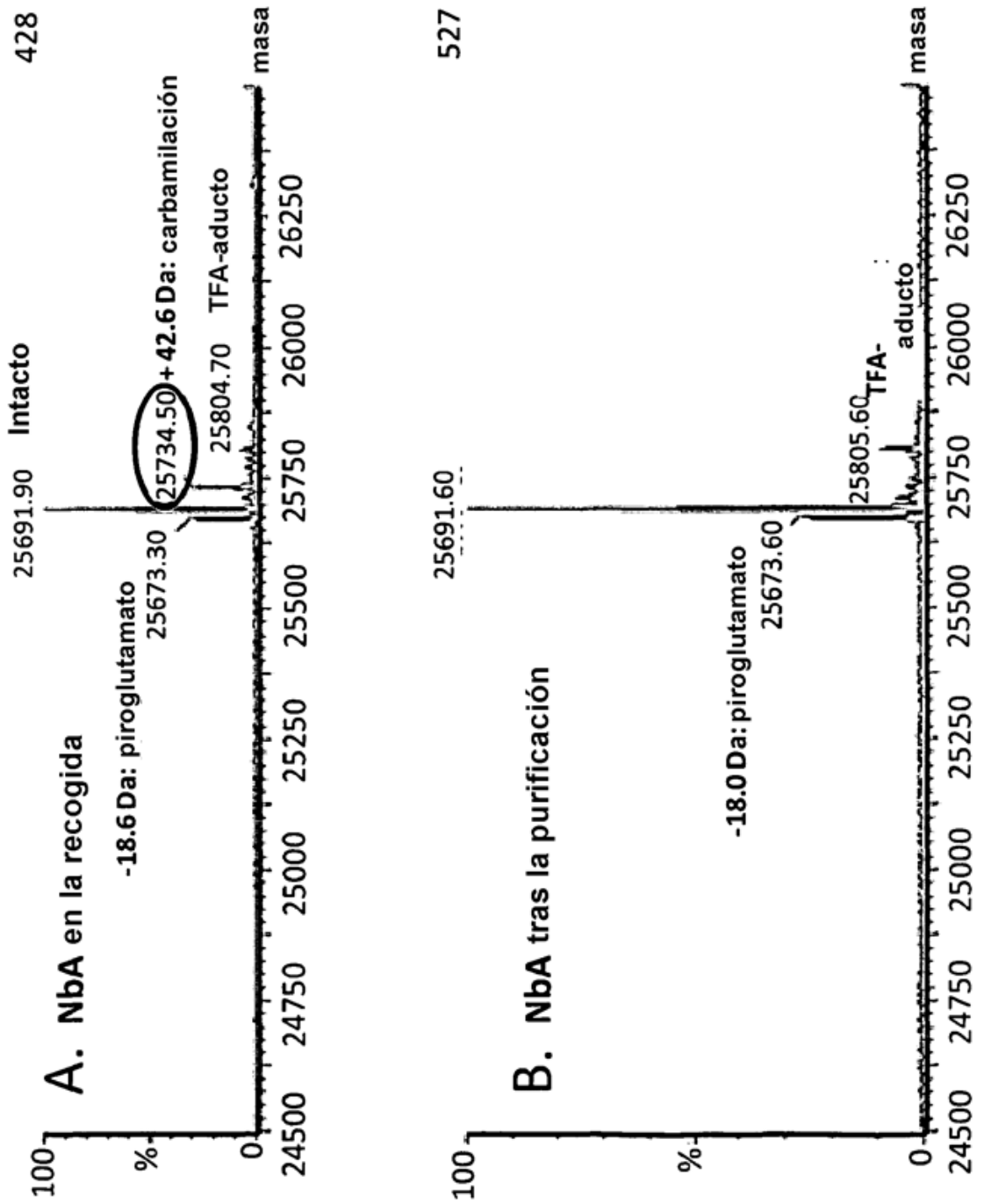
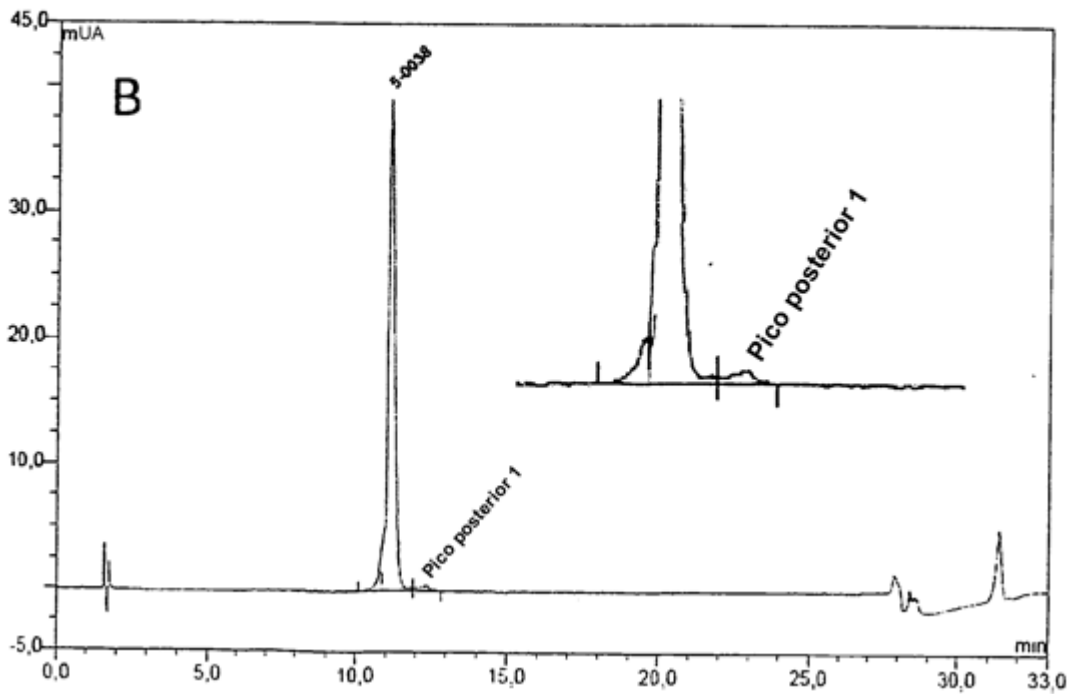
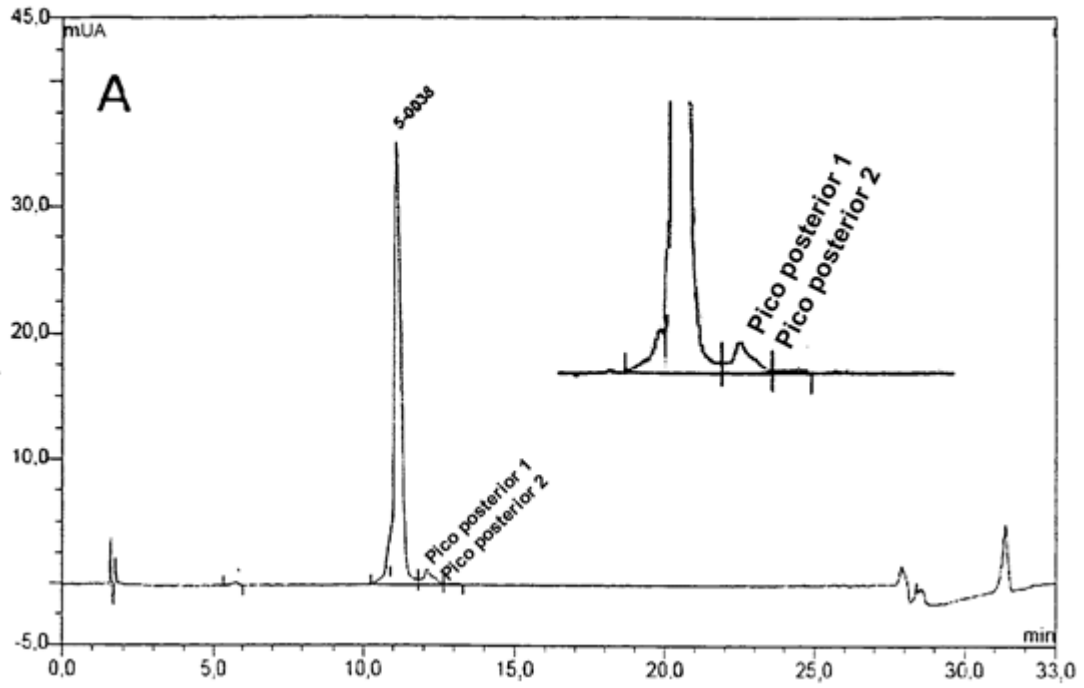


Figura 6



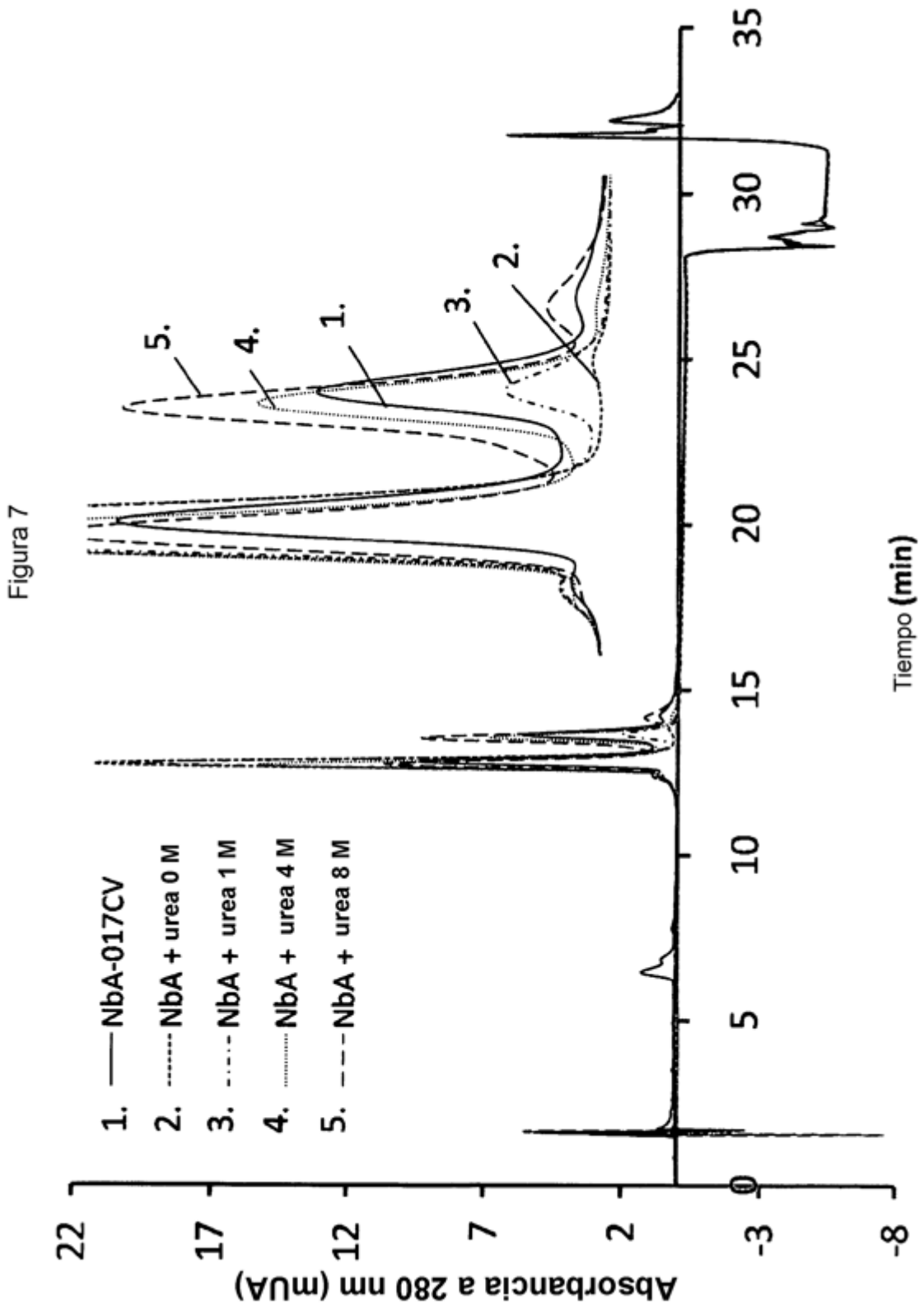


Figura 9

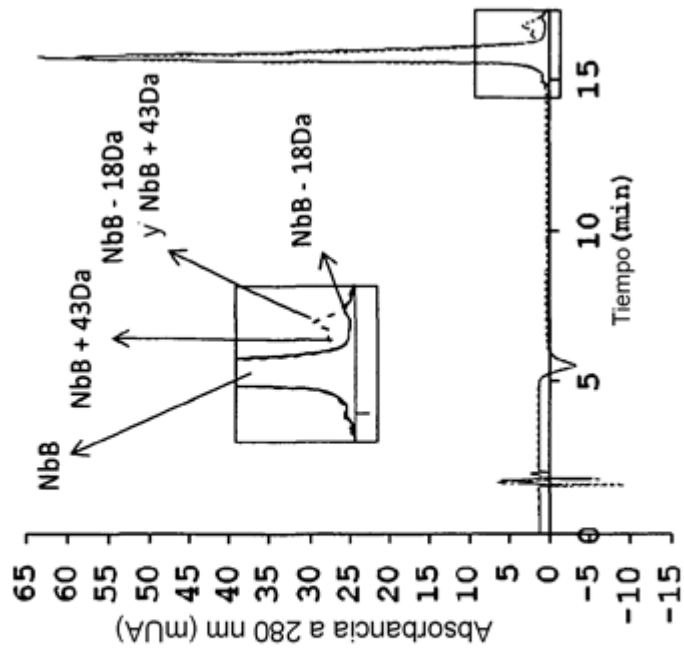


Figura 8

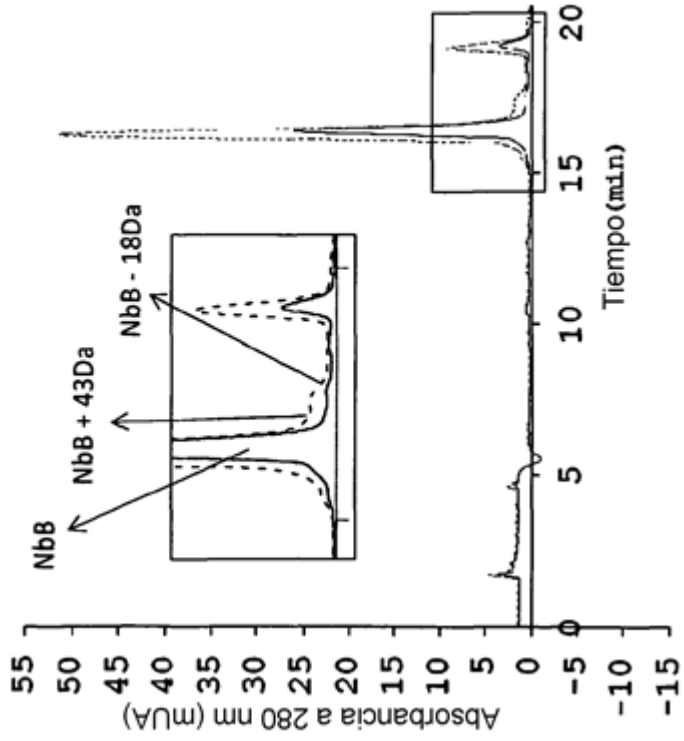


Figura 10

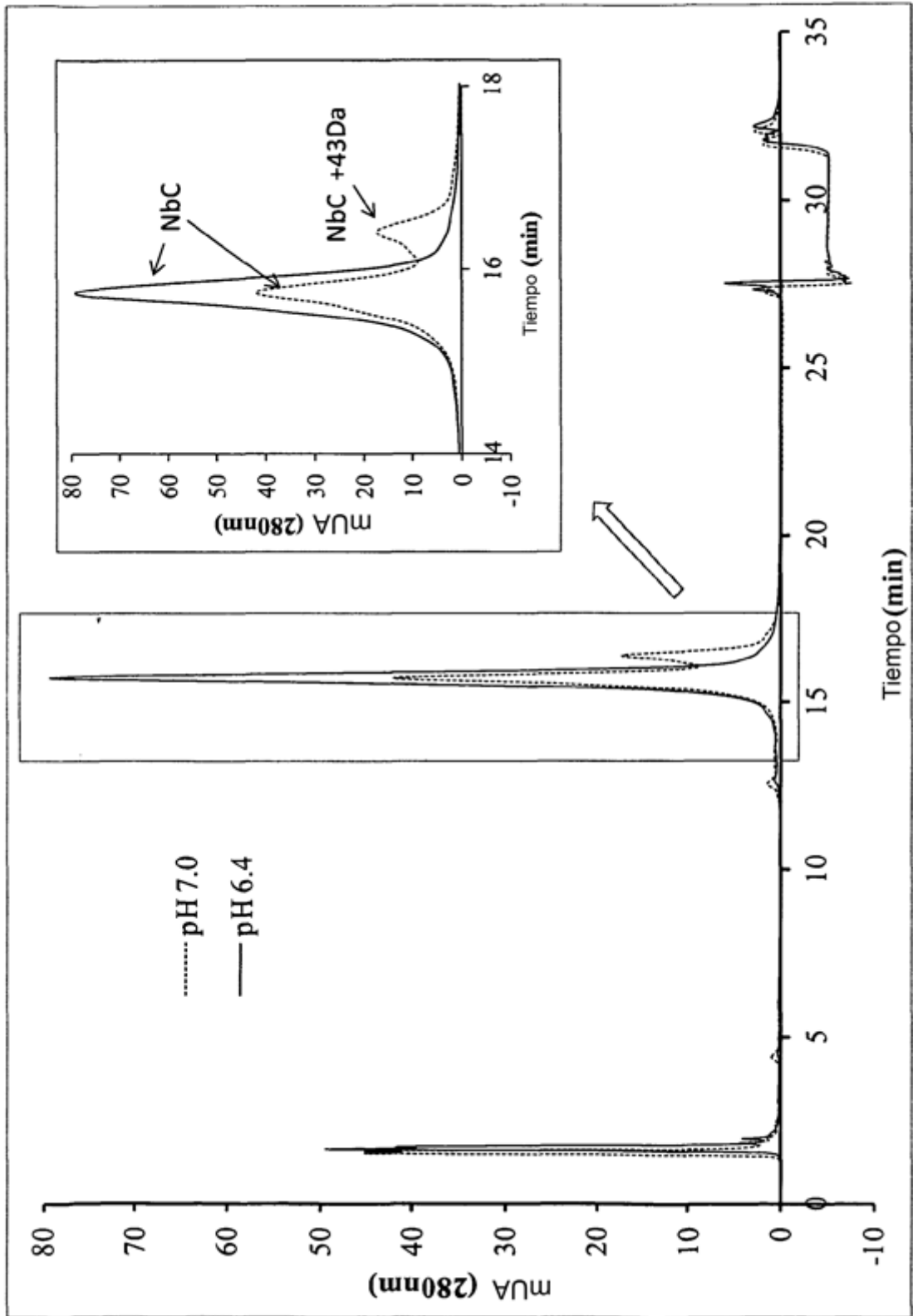


Figura 11

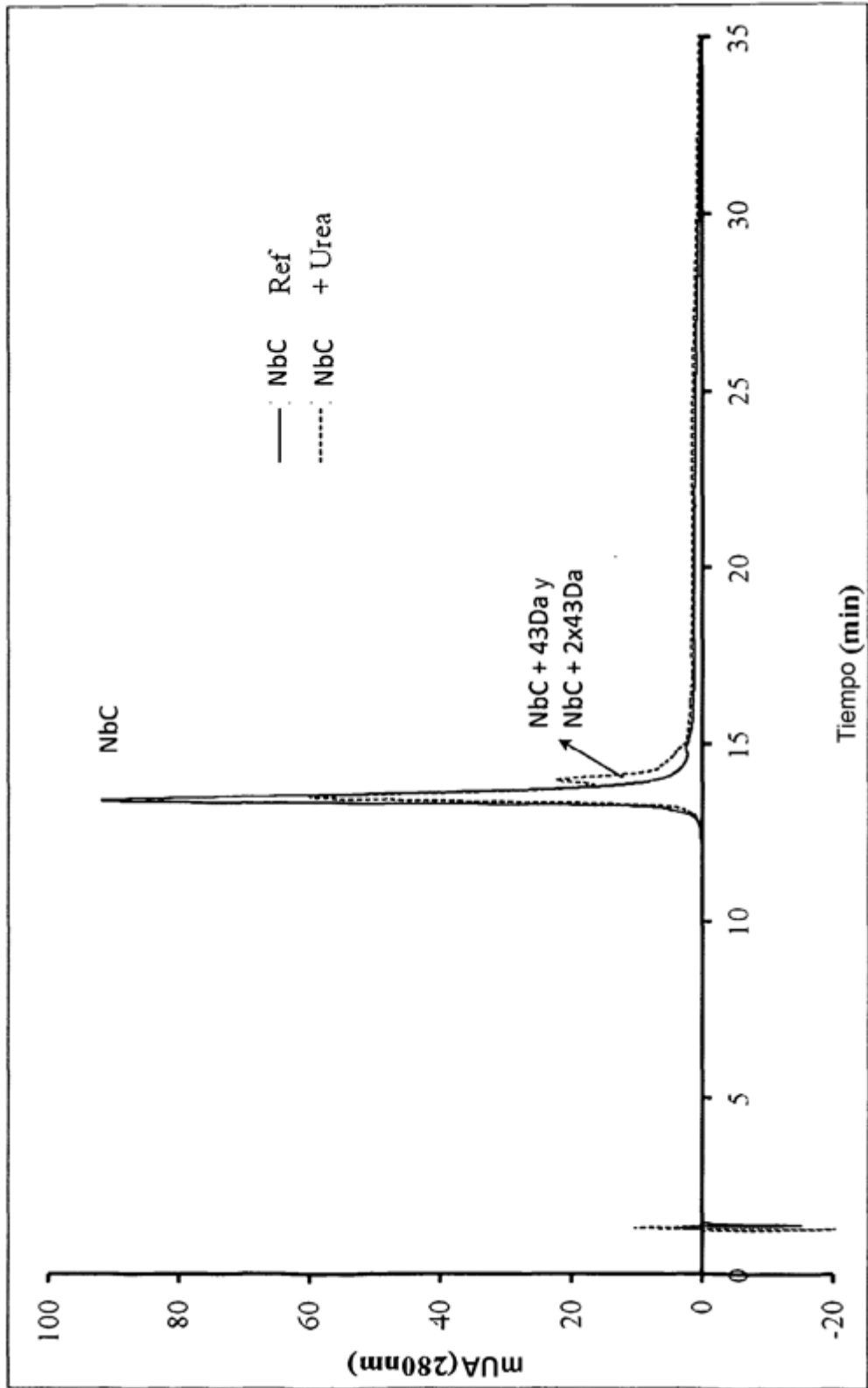


Figura 12

