



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 593**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08708212 .9**
96 Fecha de presentación : **25.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2121931**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Purificación de proteínas de fusión TACI-Fc empleando la tecnología de cuerpos grasos.**

30 Prioridad: **26.01.2007 EP 07101233**
26.01.2007 US 886681 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es: **MERCK SERONO S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, CH

72 Inventor/es: **Kornmann, Henri y**
Baer, Gianni

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 593 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

Purificación de proteínas de fusión TACI-Fc empleando la tecnología de cuerpos grasos

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, se refiere a la purificación de TACI-Fc usando cuerpos grasos modificados genéticamente que expresan la proteína A.

Antecedentes de la invención

1. Proteínas de fusión Fc

10 Las proteínas de fusión Fc son proteínas quiméricas que consisten en una región efectora de una proteína, tal como p. ej., la región de unión de un receptor, fusionada con la región Fc de una inmunoglobulina, que es con frecuencia una inmunoglobulina G (IgG). Las proteínas de fusión Fc se emplean mucho como agentes terapéuticos, ya que ofrecen ventajas conferidas por la región Fc, tales como:

- la posibilidad de purificación usando cromatografía de afinidad hacia la proteína A o la proteína G, con afinidades que varían según el isotipo de IgG. La IgG₁, IgG₂ e IgG₄ humanas se unen fuertemente a la proteína A y todas las IgGs humanas, incluyendo la IgG₃, se unen fuertemente a la proteína G; y
- 15 - una semivida incrementada en el sistema circulatorio, puesto que la región Fc se une al receptor natural FcRn que protege de la degradación lisosómica.

La semivida sérica y las funciones efectoras se pueden modular por modificación de la región Fc, para aumentar o reducir su unión a FcRn, a FcγRs y a C1q respectivamente, dependiendo del uso terapéutico destinado para la proteína de fusión Fc.

20 En la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a receptores de Fc (FcγRs) en la superficie de células inmunes efectoras, tales como células citotóxicas naturales y macrófagos, conduciendo a la fagocitosis o a la lisis de las células que son diana.

25 En la citotoxicidad dependiente del complemento, CDC, los anticuerpos destruyen las células que son dianas, desencadenando la cascada del complemento en la superficie celular. Las isoformas de IgG ejercen diferentes niveles de funciones efectoras que aumentan en el orden de IgG₄ < IgG₂ < IgG₁ ≤ IgG₃. La IgG₁ humana muestra ADCC y CDC elevadas, y es la más adecuada para uso terapéutico contra agentes patógenos y células cancerosas.

Modificando las funciones efectoras se puede conseguir mediante modificación genética que la región Fc mejore o reduzca su unión a FcγRs o a los factores del complemento.

30 La unión de IgG a los FcγRs activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) y a los FcγRs inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q), depende de residuos situados en la región bisagra y en el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son decisivas para la unión a FcγRs y al complemento C1q, y tienen secuencias únicas en IgG₂ e IgG₄. Por ejemplo, la sustitución de residuos de IgG₂ en las posiciones 233-236 en IgG₁ humana, redujo enormemente la ADCC y la CDC (Armour y otros, 1999; Shields y otros, 2001).

35 Se han realizado numerosas mutaciones en el dominio CH2 de IgG y su efecto sobre la ADCC y la CDC se sometió a ensayo *in vitro* (Shields y otros, 2001; Steurer y otros, 1995). Particularmente, se refirió que una mutación a alanina en E333 incrementaba la ADCC y la CDC (Idusogie y otros, 2000; Idusogie y otros, 2001).

40 El aumento de la semivida sérica de una proteína de fusión Fc terapéutica es otro modo de mejorar su eficacia, permitiendo niveles más elevados en circulación, una administración menos frecuente y dosis reducidas. Esto se puede conseguir mejorando la unión de la región Fc a FcR neonatal (FcRn). FcRn, que se expresa en la superficie de células endoteliales, se une a IgG en una manera dependiente del pH y la protege de la degradación. Diversas mutaciones situadas en la interfaz entre los dominios CH2 y CH3, han mostrado que incrementan la semivida de IgG₁ (Hinton y otros, 2004; Vaccaro y otros, 2005).

La Tabla 1 a continuación, resume algunas mutaciones conocidas de la región Fc de IgG (obtenida de la página de internet de Invivogen).

Tabla 1

d Fc modificado	Isotipo de IgG	Mutaciones	Propiedades	Beneficios potenciales	Aplicaciones
hlgG1e1	IgG1 humana	T250Q/M428L	Semivida plasmática incrementada	Localización mejorada de la diana; eficacia incrementada; dosis o frecuencia de administración reducidas	Vacunación; uso terapéutico
hlgG1e2	IgG1 humana	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Semivida plasmática incrementada	Localización mejorada de la diana; eficacia incrementada; dosis o frecuencia de administración reducidas	Vacunación; uso terapéutico
hlgG1e3	IgG1 humana	E233P/L234V/L235A/ΔG236 + A327G/A330S/P3	ADCC y CDC reducidas	Acontecimientos adversos reducidos	Uso terapéutico sin agotamiento celular
hlgG1e4	IgG1 humana	E33A	ADCC y CDC incrementadas	Eficacia incrementada	Uso terapéutico sin agotamiento celular
hlgG2e1	IgG2 humana	K322A	CDC reducida	Acontecimientos adversos reducidos	Vacunación; uso terapéutico

2. Purificación de las proteínas de fusión Fc

5 Las proteínas de fusión Fc tienen una importancia comercial importante como fármacos que generalmente se denominan “agentes biológicos”. Uno de los mayores desafíos es el desarrollo de procedimientos rentables y eficaces para la purificación de proteínas a escala comercial. Aunque muchos métodos están ahora disponibles para la preparación de proteínas a gran escala, productos brutos, tales como el material sobrenadante del cultivo celular, contienen no sólo el producto deseado sino también impurezas, que son difíciles de separar del producto deseado. Aunque el material sobrenadante del cultivo celular de las células que expresan productos proteicos recombinantes puede contener menos impurezas, si las células crecen en medio exento de suero, las proteínas de las células hospedadoras (HCPs) todavía se tienen que eliminar durante el procedimiento de purificación. Además, las autoridades sanitarias exigen unos niveles elevados de pureza para proteínas destinadas a la administración en seres humanos.

15 Muchos métodos de purificación contienen etapas que requieren la aplicación de un pH elevado o bajo, concentraciones elevadas de sal u otras condiciones extremas, que pueden comprometer la actividad biológica de una proteína dada. Así, para cualquier proteína es un desafío establecer un procedimiento de purificación que permita una pureza suficiente a la vez que mantiene la productividad del procedimiento en términos de precio por cantidad de proteína producida.

20 La purificación de las proteínas de fusión Fc se basa generalmente en la afinidad de la proteína de fusión Fc hacia otra proteína que está inmovilizada sobre una resina cromatográfica. Ejemplos de tales ligandos inmovilizados son las proteínas de la pared celular bacteriana, la Proteína A y la Proteína G, que tienen una especificidad hacia la porción Fc de determinadas inmunoglobulinas. Aunque la Proteína A y la Proteína G tienen una fuerte afinidad hacia los anticuerpos de IgG, tienen afinidades diversas hacia otras clases de inmunoglobulinas y también de isotipos.

25 La Proteína A es una proteína de 43.000 Dalton que es producida por la bacteria *Staphylococcus aureus* y contiene cuatro sitios de unión a las regiones Fc de IgG. La Proteína G se produce a partir del grupo G de estreptococos y tiene dos sitios de unión para la región Fc de IgG. Ambas proteínas se han caracterizado ampliamente por su afinidad hacia diferentes tipos de inmunoglobulinas. La Proteína L es otra proteína bacteriana, que se origina en *Peptostreptococcus*, que se une a inmunoglobulinas y a fragmentos de las mismas que contienen cadenas ligeras de Ig (Akerstrom y Bjorck, 1989).

30 La cromatografía de afinidad hacia la Proteína A, la Proteína G y la Proteína L se utiliza ampliamente para el aislamiento y la purificación de inmunoglobulinas. Puesto que los sitios de unión para la Proteína A y la Proteína G residen en la región Fc de una inmunoglobulina, la cromatografía de afinidad hacia la Proteína A y hacia la Proteína G, también permite la purificación de las proteínas denominadas de fusión Fc. Sin embargo, una purificación que implique una cromatografía de afinidad hacia la Proteína A, la Proteína G y la Proteína L es un procedimiento costoso y que requiere mucho tiempo.

Por lo tanto, existe una necesidad de lograr un método de purificación eficaz, sencillo y rentable para las proteínas de fusión Fc.

3. La tecnología de cuerpos grasos

5 El documento de patente de los EE.UU. número 6.924.363 (Moloney y otros, 2005) y el documento de publicación PCT WO 98/27115 divulgan una tecnología denominada "tecnología de cuerpos grasos". Esta tecnología se basa en el uso de cuerpos grasos y sus proteínas asociadas, como matrices de afinidad para la separación y la purificación de moléculas dianas. Uno de los ejemplos del documento de patente de EE.UU. número 6.924.363 y de WO 98/27115 es una prueba del concepto que muestra que un anticuerpo de conejo anti-ratón marcado se puede fijar y también eluir a partir de cuerpos grasos modificados genéticamente que expresan la Proteína A. Sin embargo, en el documento de patente de los EE.UU. número 6.924.363 y en el documento WO 98/27115, no se describe ningún procedimiento de purificación industrial de una proteína terapéutica. Además, aunque los documentos de patente de los EE.UU. número 6.924.363 y WO 98/27115 mencionan anticuerpos, no sugieren el uso de la tecnología de cuerpos grasos para la separación y/o la purificación de las proteínas de fusión Fc. No describen tampoco las condiciones óptimas para purificar anticuerpos o proteínas de fusión Fc.

15 4. Proteínas de fusión TACI-Fc

El activador transmembrana y modulador de calcio e interaccionador con el ligando de ciclofilina, denominado TACI, es un miembro de la superfamilia de TNF-R. TACI es un activador transmembrana e interaccionador de CAML (von Bulow y Bram, 1997; Gross y otros, 2000), que tiene un dominio extracelular que contiene dos seudorepeticiones ricas en cisteína. TACI se une a dos miembros de la familia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF). Un ligando se denomina BLyS, BAFF, neutrocina- α , TALL-1, zTNF4 o THANK (Moore y otros, 1999). El otro ligando se ha designado APRIL, ligando-1 del dominio letal TNRF o ZTNF2 (Hahne y otros, 1998).

Las proteínas de fusión que contienen formas solubles del receptor TACI fusionadas con una región Fc de IgG, también se conocen y se denominan TACI-Fc (documentos WO 00/40716, WO 02/094852). TACI-Fc inhibe la unión de BLyS y de APRIL a linfocitos B (Xia y otros, 2000). Se está desarrollando para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, que incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y neoplasias hematológicas, así como para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM). Además de esto, TACI-Fc se está desarrollando en mieloma múltiple (MM) (Novak y otros, 2004) y linfoma no-Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC) y macroglobulemia de Waldenstrom (MW). La molécula que se denomina ataccept, que está actualmente en pruebas clínicas, es por ejemplo una proteína de fusión TACI-Fc.

30 TACI-Fc es activo como un dímero que comprende dos proteínas de TACI-Fc. Al producir TACI-Fc, también se obtienen agregados que comprenden dos o más dímeros. El procedimiento de purificación de TACI-Fc debe permitir por tanto, reducir el porcentaje de agregados de TACI-Fc.

Los métodos para purificar TACI-Fc que están disponibles en la técnica, implican una cromatografía de la Proteína A. Por ejemplo, Wu y otros. (2000) describen la purificación de la proteína de fusión TACI-Fc mediante cromatografía de la Proteína A, cargándose la columna cromatográfica con resina para cromatografía HyperD[®] para eliminación de disolvente y detergente.

Dada la utilidad terapéutica de TACI-Fc, existe una necesidad de obtener cantidades significativas de dímeros purificados de TACI-Fc, usando un procedimiento sencillo y rentable.

Sumario de la invención

40 La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento de purificación para TACI-Fc basado en la tecnología de cuerpos grasos.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un método para purificar una proteína TACI-Fc que comprende las etapas de:

45 a) mezclar una solución que comprende cuerpos grasos con proteína A con una muestra que comprende dicha proteína TACI-Fc, a fin de obtener una relación final en mg de proteína TACI-Fc por mg de peso seco de los cuerpos grasos, dentro de un intervalo desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5,5; y

b) separar dichos cuerpos grasos con proteína A de dicha proteína TACI-Fc, añadiendo una solución acuosa que tiene un pH comprendido dentro de un intervalo de 3,5 a 3,9,

50 en donde la solución que comprende TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b), comprende más de 93%, 94%, 95% o 96% de dímeros de TACI-Fc.

Un segundo aspecto de la invención se dirige a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende TACI-Fc, que comprende las etapas de:

a) purificar dicha TACI-Fc según el método de la invención; y
b) formular dicha TACI-Fc purificada en una composición farmacéutica.

Se describe el uso de cuerpos grasos con proteína A para purificar TACI-Fc.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1A es un esquema de un cuerpo graso tomado del sitio de internet de SemBioSys Genetics Inc.

5 La Figura 1B es un diagrama esquemático que ilustra un cuerpo graso con proteína A que expresa una proteína de fusión de oleosina-proteína A, estando unida dicha proteína de fusión de oleosina-proteína A a una inmunoglobulina. Esta figura se corresponde con la Figura 15 del documento de patente de EE.UU. n° 6.924.363 de SemBioSys Genetics Inc.

10 La Figura 2 muestra los resultados de la electroforesis de microfluidos de la captura del material recolectado de TACI-Fc5 (pistas 1 a 8) y de muestras humanas de IgG1 kappa (pistas 9 a 12), obtenidos al realizar el experimento descrito en el Ejemplo 1. La pista L corresponde a la escala. La pista 1 corresponde a la muestra que contiene TACI-Fc antes de la purificación. Las pistas 2 y 10 corresponden al "flujo continuo", es decir, la fracción de las muestras de TACI-Fc5 y de IgG1 kappa humana que no se unían a los cuerpos grasos. Las pistas 3 a 5 corresponden al material recolectado obtenido después de los tres lavados consecutivos, descritos en el Ejemplo 1.3. Las pistas 6 a 8 corresponden al material recolectado obtenido después de tres eluciones consecutivas descritas en el Ejemplo 1.4. La pista 9 corresponde a la muestra que contiene IgG1 antes de la purificación. La pista 11 corresponde a la fracción obtenida después de la etapa de lavado. La pista 12 corresponde a la fracción obtenida después de la primera etapa de elución.

La Figura 3 muestra el análisis de la capacidad de carga de TACI-Fc, recolectado sobre los cuerpos grasos con StratoCapture® (véase el Ejemplo 2).

20 Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de longitud completa del receptor TACI humano (p. ej., descrito en el documento WO 98/39361).

25 SEQ ID NO: 2 es una proteína TACI-Fc preferida de acuerdo con la invención, que comprende secuencias obtenidas a partir de la porción extracelular de TACI y de una porción Fc de IgG1 humana (p. ej., descrita en el documento WO 02/094852).

SEQ ID NO: 3 es un polinucleótido que codifica la proteína TACI-Fc de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 es una proteína de fusión preferida de oleosina-proteína A según la invención (p. ej., descrita en el documento de patente de los EE.UU. número 6.924.363).

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se basa en el desarrollo de un método de purificación para TACI-Fc. TACI-Fc se une y se eluye a partir de los cuerpos grasos, usando las condiciones experimentales desarrolladas en el marco de la presente invención (véase el Ejemplo 1). Los resultados mejores se obtuvieron cuando:

- se cargaron 5 gramos de TACI-Fc por gramo de peso seco de los cuerpos grasos (véase el Ejemplo 2); y
- los cuerpos grasos se eluyeron a un pH de aproximadamente 3,5 (véase el Ejemplo 3).

35 Además, los cuerpos grasos mostraron de forma asombrosa y ventajosa una selectividad más elevada hacia los dímeros de TACI-Fc (el 96% en la fracción posterior a la captura) que la cromatografía de la proteína A (véase el Ejemplo 3).

40 La tecnología de cuerpos grasos ofrece el potencial para transformar el procedimiento costoso y caro de la purificación cromatográfica por lotes, de una proteína de fusión Fc, tal como, p. ej., TACI-Fc, en un procedimiento económico conveniente basado en cuerpos grasos con proteína A, como reactivo desechable.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para purificar una proteína TACI-Fc que comprende las siguientes etapas:

45 a) mezclar una solución que comprende cuerpos grasos con proteína A con una muestra que comprende dicha proteína TACI-Fc a fin de obtener una relación final en mg de proteína TACI-Fc por mg de peso seco de los cuerpos grasos, dentro de un intervalo desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6; y

b) separar dichos cuerpos grasos con proteína A de dicha proteína TACI-Fc, añadiendo una solución acuosa que tiene un pH comprendido dentro de un intervalo de 3,5 a 3,9,

en donde la solución que comprende TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b), comprende más de 93%, 94%, 95% o 96% de dímeros de TACI-Fc.

50 Los cuerpos grasos son lipoesferas revestidas con proteína que se forman en la naturaleza en semillas vegetales,

para actuar en el almacenamiento de triglicéridos (aceite) (véase la Figura 1A). Los cuerpos grasos son orgánulos subcelulares pequeños y esféricos, que encapsulan los triacilglicéricos almacenados, una reserva de energía utilizada por numerosas plantas. Aunque se encuentran en la mayoría de las plantas y en diferentes tejidos, son particularmente abundantes en las semillas de plantas oleaginosas, en donde tienen un intervalo en tamaño desde menos de una micra hasta varias micras de diámetro. Los cuerpos grasos comprenden triacilglicéricos rodeados por una membrana de media unidad de fosfolípidos y están embebidos con un único tipo de proteína conocido como una proteína de cuerpo graso. La expresión "cuerpo graso" o "cuerpos grasos", tal y como se utiliza en esta memoria, incluye cualquiera o todos los componentes de triacilglicérido, fosfolípido o proteicos presentes en la estructura completa. La expresión "proteína de cuerpo graso" tal y como se utiliza en esta memoria, significa una proteína que está presente en la naturaleza en un cuerpo graso. En los vegetales, las proteínas predominantes en los cuerpos grasos se denominan "oleosinas". Las oleosinas se han clonado y secuenciado a partir de numerosas fuentes vegetales, incluyendo el maíz, la colza, la zanahoria y el algodón. La proteína oleosina parece que comprende tres dominios; los dos extremos de la proteína, los extremos N- y C-terminales, son muy hidrófilos y residen en la superficie del cuerpo graso expuesto al citosol, mientras que el núcleo central muy hidrófobo de la oleosina está anclado firmemente dentro de la membrana y del triacilglicérido. Las oleosinas procedentes de diferentes especies representan una pequeña familia de proteínas que muestran una conservación considerable de la secuencia de aminoácidos, particularmente en la región central de la proteína. Dentro de una especie individual, puede existir una pequeña cantidad de diferentes isoformas. Los cuerpos grasos, las proteínas asociadas con los cuerpos grasos y/o las oleosinas se pueden modificar genéticamente para las proteínas recombinantes que se expresen en la superficie de los cuerpos grasos.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "cuerpo graso con proteína A" se refiere a un cuerpo graso que se ha modificado genéticamente de modo que la proteína A o los dominios de la proteína A que se unen a IgG, se expresan en la superficie de los cuerpos grasos modificados genéticamente. Tales cuerpos grasos con proteína A se describen, p. ej., en el documento de patente de los EE.UU. número 6.924.363 (Moloney y otros, 2005) y los proporcionan, por ejemplo, SemBioSys Genetics Inc. bajo el nombre comercial de StratoCapture[®].

En una realización preferida de acuerdo con la invención, la proteína A o los dominios de la proteína A que se unen a IgG, se fusionan con una oleosina (véase la Figura 1B). Tales proteínas de fusión se denominan "proteínas de fusión de oleosina-proteína A" a lo largo de la presente memoria descriptiva. El cuerpo graso con proteína A de esta realización preferida se denomina "cuerpo graso con oleosina-proteína A". La proteína de SEQ ID NO: 4 es una proteína de fusión preferida de oleosina-proteína A, de acuerdo con la invención, que consiste en un dominio de la proteína A que se ha fusionado con la oleosina de *Arabidopsis* de 18 kDa (van Rooijen y otros, 1992). Esta proteína de fusión de oleosina-proteína A se puede construir tal y como se describe, p. ej., en el Ejemplo 9 del documento de patente de los EE.UU. número 6.924.363. Una secuencia sintética de la proteína A que codifica una proteína capaz de unirse a IgG, se sintetizó basándose en la información presentada de la secuencia (pRIT2T, vector de fusión del gen de la proteína A; Pharmacia). El fragmento resultante de proteína A se ligó en un plásmido pUC19 que era portador del gen de la oleosina de *Arabidopsis*, que comprendía una región promotora aguas arriba, de 867 pb, seguida por la región codificadora (con su intrón asociado) de la cual se había eliminado el codón de detención de la traducción. El extremo 3' de la estructura artificial contiene el terminador de la transcripción de la sintasa de nopalina. Una secuencia espaciadora que codificaba una secuencia de reconocimiento de la endoproteasa de la trombina, se incorporó inmediatamente aguas abajo de la secuencia codificadora de oleosina. La secuencia génica de la proteína A se introdujo entre esta secuencia espaciadora y la secuencia de terminación. En la estructura artificial final de expresión, las regiones codificadoras de la proteína A y de oleosina se fusionaron en el mismo marco de lectura, conduciendo a una secuencia que codificaba la proteína de SEQ ID NO: 4. La estructura artificial completa se escindió a continuación del plásmido pUC19 y se subclonó en el vector de transformación vegetal pCGN1559 (McBride y Summerfelt, 1990) que es portador de un gen de la fosfotransferasa de neomicina bajo el control del promotor 35S de CaMV. El plásmido resultante se introdujo en *Agrobacterium* (cepa EHA101).

Los cuerpos grasos con proteína A de la invención se obtienen preferiblemente a partir de una semilla y más preferiblemente a partir del grupo de especies vegetales que comprenden: berro de Thale (*Arabidopsis thaliana*), colza (*Brassica* spp.), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), aceite de palma (*Elaeis guineensis*), semilla de algodón (*Gossypium* spp.), cacahuete (*Arachis hypogaea*), coco (*Cocos nucifera*), ricino (*Ricinus communis*), cártamo (*Carthamus linctorius*), mostaza (*Brassica* spp. y *Sinapis alba*), cilantro (*Coriandrum sativum*), lino (*Linum usitatissimum*) y maíz (*Zea mays*). Las plantas se dejan crecer y se permite el desarrollo de semillas empleando prácticas de cultivo agrícola, bien conocidas por un experto en la técnica. Después de recoger la semilla y eliminar el material extraño, tal como piedras o cáscaras de la semilla, por ejemplo tamizando, las semillas se secan preferiblemente y posteriormente se procesan mediante prensado mecánico, moliendo o triturando. La fracción de cuerpos grasos con proteína A se puede obtener a partir de la fracción triturada de la semilla, aprovechando las técnicas de separación que se benefician de diferencias en la densidad entre la fracción de cuerpos grasos con proteína A y la fracción acuosa, tal como la centrifugación, o usando técnicas de separación que se basan en la exclusión por tamaño, tales como la filtración a través de una membrana, o una combinación de ambas. Típicamente, las semillas se muelen a fondo en cinco volúmenes de un tampón acuoso frío. Se puede emplear una amplia variedad de composiciones de tampón, a condición de que no contengan concentraciones elevadas de disolventes orgánicos fuertes, tales como acetona o éter dietílico, ya que estos disolventes pueden destruir los cuerpos grasos con proteína A. La densidad de la solución del tampón de trituración se puede incrementar con la adición de sacarosa 0,4-0,6 M, para facilitar el lavado, tal y como se describe más abajo. El tampón de trituración también contendrá típicamente NaCl 0,5 M, para

ayudar a eliminar las proteínas solubles que no están unidas integralmente a la superficie del cuerpo graso con proteína A. Después de triturar, el material homogeneizado se centrifuga dando como resultado un sedimento de materia en partículas y de materia insoluble, una fase acuosa que contiene los componentes solubles de la semilla y una capa superficial que comprende los cuerpos grasos con proteína A con sus proteínas asociadas. La capa de cuerpos grasos con proteína A se recoge de la superficie y se resuspende a fondo en un volumen de tampón de trituración de nuevo aporte. Es importante que los agregados de los cuerpos grasos con proteína A se disocien lo máximo posible para asegurar una eliminación eficaz de los agentes contaminantes en las etapas de lavado subsiguientes. La preparación de cuerpos grasos con proteína A resuspendida, se estratifica bajo una solución de flotación de densidad inferior (p. ej., agua, tampón acuoso) y se centrifuga, separando de nuevo los cuerpos grasos con proteína A y las fases acuosas. El procedimiento de lavado se repite típicamente al menos tres veces, después de lo cual los cuerpos grasos con proteína A se consideran suficientemente exentos de proteínas solubles contaminantes, según se determina por electroforesis en gel. No es necesario eliminar toda la fase acuosa y se puede añadir agua o Tris HCl 50 mM pH 7,5 a la preparación final y si se desea, el pH se puede reducir a pH 2 o elevar a pH 10. Protocolos para aislar cuerpos grasos a partir de semillas oleaginosas están disponibles en la técnica (Moloney y otros, 2005). Los cuerpos grasos con proteína A distintos a los obtenidos a partir de vegetales, también se pueden utilizar en la presente invención. Un sistema funcionalmente equivalente a los cuerpos grasos y las oleosinas vegetales modificados genéticamente, se ha descrito en bacterias (Pieper-Furst y otros, 1994), algas y hongos (Ting y otros, 1997). Los cuerpos grasos con proteína A procedentes de estos organismos, así como los que se puedan descubrir en otras células vivas por un experto en la técnica, también se pueden emplear de acuerdo con la presente invención.

Tal y como se emplea en esta memoria, las expresiones "TACI-Fc" y "una proteína TACI-Fc" se refieren a una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de TACI, o a un fragmento del mismo que se une por lo menos a Blys o a APRIL, fusionado a una región Fc de una inmunoglobulina. La región Fc de una inmunoglobulina también se denomina como el "resto Fc" de TACI-Fc. Un ensayo para someter a ensayo la capacidad de unión a Blys o a APRIL, se describe p. ej., en Hymowitz y otros, 2005. TACI es preferiblemente TACI humano. SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del receptor TACI humano de longitud completa (también número de orden de SwissProt. 014836). Preferiblemente, el fragmento obtenido a partir de TACI comprende por lo menos los aminoácidos 33 a 67 de SEQ ID NO: 2 y/o los aminoácidos 70 a 104 de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, el fragmento obtenido a partir de TACI comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 166 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 30 a 166 de SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 30 a 119 de SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 30 a 110 de SEQ ID NO: 1. Todos los fragmentos obtenidos a partir de TACI, se prefieren para la preparación de la proteína TACI que se purificará por el método de la invención y se combinan con un resto Fc. Una proteína TACI altamente preferida que se purificará de acuerdo con la presente invención, comprende o consiste en SEQ ID NO: 2.

Por lo tanto, es altamente preferido que TACI-Fc comprenda un polipéptido seleccionado a partir de:

a) los aminoácidos 34 a 66 de SEQ ID NO: 1;

b) los aminoácidos 71 a 104 de SEQ ID NO: 1;

c) los aminoácidos 34 a 104 de SEQ ID NO: 1;

d) los aminoácidos 30 a 110 de SEQ ID NO: 1;

e) SEQ ID NO: 2;

f) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida con el complemento de SEQ ID NO: 3 bajo condiciones muy rigurosas;

g) una muteína de cualquiera de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) que tiene una identidad de la secuencia de por lo menos el 80% o 85% o 90% o 95% o 99% con el polipéptido de (c), (d), (e) o (f); y

h) un derivado funcional de cualquiera de (a), (b), (c), (d), (e), (f) o (g),

en donde el polipéptido se une por lo menos a Blys o a APRIL.

El término "muteínas", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a análogos de TACI-Fc, en los cuales uno o varios de los residuos de aminoácidos de TACI-Fc están sustituidos por diferentes residuos de aminoácidos, o están deletados, o uno o varios de los residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia original de TACI-Fc, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes, en comparación con el TACI-Fc original. Estas muteínas se preparan por técnicas de síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención, incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una proteína TACI-Fc según SEQ ID NO: 2, bajo condiciones rigurosas. Un ejemplo de una secuencia de ADN que codifica una TACI-Fc es SEQ ID NO: 3.

La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de la hibridación y del lavado posterior, a las que un experto ordinario en la técnica se refiere convencionalmente como "rigurosas". Véase, Ausubel y otros, Current

Protocolos in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., apartados 6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido sometido a estudio, p. ej., 2 x SSC y 0,5% de SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y a continuación, 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica saben que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o de las sondas de oligonucleótidos mezcladas. Si se emplean sondas mezcladas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase, Ausubel, supra.

La identidad refleja una relación entre dos o varias secuencias polipeptídicas o dos o varias secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. La identidad se refiere generalmente a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido, de las dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando. Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un “% de identidad”. Las dos secuencias que se van a comparar se alinean generalmente para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de “espacios de separación” en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Un % de identidad se puede determinar sobre la longitud total de cada una de las secuencias que se van a comparar (denominada, alineación global), esta es particularmente adecuada para secuencias con la misma longitud o muy similar, o para longitudes definidas más cortas (denominada, alineación local), que es más adecuada para secuencias de longitud desigual. Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o varias secuencias son bien conocidos en la técnica. Así por ejemplo, los programas disponibles en el paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux y otros, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, se pueden utilizar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT emplea el algoritmo de “homología local” de (Smith y Waterman, 1981) y encuentra la región aislada de similitud mejor entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias, también se conocen en la técnica, por ejemplo la familia de programas de BLAST (Altschul y otros, 1990; Altschul y otros, 1997), accesible a través de la página inicial del NCBI en el sitio de internet ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson, 1990). Se prefiere especialmente que el % de identidad entre dos secuencias se determine usando el algoritmo de KERR (Dufresne y otros, 2002), por ejemplo usando una herramienta bioinformática, tal como p. ej., GenePAST.

Cualquier muteína tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos que duplica suficientemente la de TACI-Fc, de modo que tenga una actividad de unión al ligando, sustancialmente similar a la de una proteína de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, una actividad de TACI es su capacidad para unirse a Blys o a APRIL (Hymowitz y otros, 2005). Mientras que la muteína tenga una actividad de unión sustancial a APRIL o Blys, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a TACI-Fc. Así, el experto en la técnica puede determinar fácilmente si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que una proteína de SEQ ID NO: 2, por medio de una experimentación rutinaria.

En una realización preferida, cualquier muteína tal tiene una identidad o una homología con la misma de, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95% o por lo menos el 99%.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención, son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de TACI-Fc pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de modo que la sustitución entre los miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y las deleciones de aminoácidos también se pueden realizar en las secuencias definidas anteriormente, sin alterar su función, particularmente si las inserciones o las deleciones implican solamente algunos aminoácidos, p. ej., menos de treinta, menos de veinte, o preferiblemente menos diez, y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son decisivos para una conformación funcional, p. ej., residuos de cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones están dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos conservadores son los definidos en la Tabla 2. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 3; y lo más preferido, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 4.

Tabla 2
Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu

Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA 3
Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg, Lys, His
Leu	Ile, Phe, Met, Leu
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Met, Ile, Val
Gly	Gly
Ile	Met, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Cys
His	Gln, Arg, His
Gln	Glu, His, Gln
Asn	Asp, Asn

Lys	Arg, Lys
Asp	Asn, Asp
Glu	Gln, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA 4
Grupos los más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Ile, Met, Leu
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Met, Leu, Ile
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Ser, Cys
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Ile, Leu, Met
Trp	Met

- 5 Los “derivados funcionales” tal y como se utilizan en esta memoria, abarcan derivados de TACI-Fc que se van a purificar de acuerdo con la presente invención, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los residuos o los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención mientras que sean farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de TACI-Fc que es sustancialmente similar a la actividad de la proteína TACI-Fc sin modificar, tal y como se ha definido anteriormente, y no confieren propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

10 Derivados funcionales de TACI-Fc se pueden conjugar, p. ej., con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la semivida, la biodisponibilidad, la tolerancia en el cuerpo humano o la inmunogenicidad. Para conseguir este objetivo, TACI-Fc se puede ligar, p. ej., a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede realizar por métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

- 15 Los derivados funcionales también pueden incluir, por ejemplo, ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de

los grupos carboxilo por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados n-acílicos de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilo (p. ej., grupos alcanóilo o aroílo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo el de residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo.

- 5 Los restos Fc de TACI-Fc se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina humana o animal (Ig) que es preferiblemente una IgG. La IgG puede ser una IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. También se prefiere que el resto Fc se obtenga a partir de la cadena pesada de una inmunoglobulina, preferiblemente una IgG. Más preferentemente, el resto Fc comprende una porción, tal como p. ej., un dominio, de una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Tal región constante de la Ig comprende preferiblemente por lo menos un dominio constante de Ig seleccionado a partir de cualquier dominio de la bisagra, dominio CH₂, CH₃, o de cualquier combinación de los mismos. Se prefiere que el resto Fc comprenda por lo menos un dominio CH₂ y CH₃. Se prefiere aún más, que el resto Fc comprenda la región bisagra de IgG, el dominio CH₂ y CH₃. Preferiblemente, TACI-Fc comprende una región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, más preferiblemente una región constante humana. Lo más preferible, la inmunoglobulina es una IgG₁. También se prefiere que la región constante comprenda una bisagra, un dominio CH₂ y un dominio CH₃.

Una realización preferida se dirige a un método para purificar TACI-Fc según la invención, en donde la solución que comprende TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b) comprende más de 97%, 98% o 99% de formas dimeras de TACI-Fc. De hecho, tal y como se muestra en la Tabla 6 del Ejemplo 3, el método de la invención mostraba una selectividad más elevada hacia los dímeros de TACI-Fc que la cromatografía de la proteína A.

- 20 En una realización preferida del presente procedimiento de purificación, se realizan una o varias etapas de lavado. Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "lavado" se refiere a un método que comprende las etapas de:

(i) suspender los cuerpos grasos con proteína A en una solución acuosa;

(ii) centrifugar la suspensión; y

(iii) eliminar la fase acuosa subyacente, comprendiendo la fase superior los cuerpos grasos con proteína A.

- 25 Dicha etapa de lavado se puede realizar, por ejemplo, entre la etapa (a) y la (b) del método de acuerdo con la invención, y/o antes de realizar la etapa (a).

Las centrifugaciones se pueden realizar, p. ej., a 5000 x g, 6000 x g, 7000 x g, 8000 x g, 9000 x g, 10000 x g, 11000 x g, 12000 x g, 13000 x g, 14000 x g, 15000 x g, 16000 x g, 17000 x g, 18000 x g, 19000 x g o 20000 x g durante aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 min. Preferiblemente, las centrifugaciones se realizan a 10000 x g durante 10 min.

- 30 Preferiblemente, los cuerpos grasos con proteína A se lavan con un tampón a un pH dentro de un intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 8,5, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8, desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7,5. Lo más preferible, los cuerpos grasos con proteína A se lavan con un tampón a un pH de aproximadamente 7.

- 35 También preferiblemente, el tampón utilizado para lavar los cuerpos grasos con proteína A, es un tampón fosfato.

También preferiblemente, la etapa de lavado se repite al menos 2, 3, 4 o 5 veces, lo más preferible 3 veces.

- En otra realización preferente del presente procedimiento de purificación, la relación final de mg de proteína TACI-Fc por mg en peso seco de cuerpos grasos con proteína A, en la etapa (a) está dentro de un intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6, desde aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5,5, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5, desde aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,8, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 4,6, desde aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, o desde aproximadamente 4 a 5,5. Preferiblemente, la relación final de mg de proteína TACI-Fc por mg en peso seco de cuerpos grasos con proteína A, en la etapa (a) es de aproximadamente 4, de aproximadamente 4,25, de aproximadamente 4,5, de aproximadamente 4,75, de aproximadamente 5, de aproximadamente 5,25, de aproximadamente 5,5, de aproximadamente 5,75 o de aproximadamente 6. Cuando se purifica TACI-Fc, se prefiere más que la relación final de mg de TACI-Fc por mg en peso seco de cuerpos grasos con proteína A, en la etapa (a) sea de aproximadamente 4, de aproximadamente 5 o de aproximadamente 5,5.

La etapa (b) se puede denominar como "etapa de elución", y la separación de los cuerpos grasos con proteína A de la proteína TACI-Fc, se puede realizar, por ejemplo, del modo siguiente:

- 50 (i) suspendiendo los cuerpos grasos con proteína A en una solución acuosa;

(ii) centrifugando la suspensión; y

(iii) recogiendo la fase acuosa subyacente que comprende la proteína TACI-Fc purificada, p. ej., utilizando una jeringa.

En una realización preferida del presente procedimiento de purificación, la etapa (b) se realiza añadiendo una solución acuosa que tiene un pH de aproximadamente 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 o 3,9, lo más preferible, aproximadamente 3,5.

Preferiblemente, la solución acuosa utilizada en la etapa (b), comprende acetato, p. ej., acetato aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 mM.

5 También preferiblemente, la etapa de la etapa (b) se repite por lo menos 2, 3, 4 o 5 veces, preferiblemente 3 veces.

El procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención, puede comprender adicionalmente una etapa (c) de filtración de la solución, que comprende dicha proteína TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b). Preferiblemente, el tamaño de poro del filtro es de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 μM .

10 El procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención, puede comprender adicionalmente una etapa (d) de neutralización de la solución obtenida al final de la etapa (c) (o de la etapa (b) en caso de que la etapa (c) no se realice). La solución se puede neutralizar, p. ej., empleando NaOH. Preferiblemente, se utiliza NaOH 1 M.

15 Opcionalmente, el procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención puede comprender una o varias etapas de purificación suplementarias, usando cualquier método conocido en la técnica anterior, como por ejemplo, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico y/o una cromatografía de hidroxapatito. Estas etapas de purificación suplementarias se denominan comúnmente "etapas de pulido" por el especialista en la materia. Específicamente, los métodos conocidos en la técnica para purificar proteínas de fusión Fc, comprenden una primera etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad hacia la proteína A, la proteína G o la proteína L y etapas de pulido adicionales que tienen como objetivo obtener tanta pureza como sea adecuada para la administración en humanos. De acuerdo con la presente invención, la etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad hacia la proteína A, la proteína G o la proteína L, se sustituye por una etapa de purificación usando cuerpos grasos con proteína A y las etapas de pulido se realizan según lo conocido ya en la técnica. Por ejemplo, las etapas de pulido pueden comprender la etapa de eliminar restos exentos de Fc, mediante cromatografía de intercambio catiónico según lo descrito en el documento de solicitud de patente europea nº 06 119.611.9. Por ejemplo, las etapas de pulido se pueden realizar según lo descrito en el documento de solicitud de patente europea nº 06 119.610.1. Esto conduciría, p. ej., a un procedimiento de purificación de TACI-Fc que comprendería las siguientes etapas:

(i) purificar un fluido que comprende TACI-Fc usando cuerpos grasos con proteína A, tal y como se ha descrito en la presente invención;

(ii) someter el material eluido de la etapa (a) a una cromatografía de intercambio catiónico;

30 (iii) someter el material eluido de la etapa (b) a una cromatografía de intercambio aniónico; y

(iv) someter el flujo continuo de la etapa (c) a una cromatografía de hidroxapatito y recoger el material eluido para obtener TACI-Fc purificada.

35 Opcionalmente, la proteína TACI-Fc se formula en una composición farmacéutica al final del procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención, es decir, uno o varios vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables o similares, se añaden a la solución que comprende la proteína TACI-Fc que se obtiene al final del procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención.

40 La definición de "farmacéuticamente aceptable" se entiende que abarca cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular en una forma de dosificación unitaria para la inyección en vehículos, tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina sérica y solución de Ringer.

45 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, se pueden administrar a un individuo en una variedad de formas. Las vías de administración incluyen la vía intradérmica, transdérmica (p. ej., en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz se puede utilizar, por ejemplo, la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica, en donde una molécula de ADN que codifica al agente activo se administra al paciente (p. ej., a través de un vector), que causa que el agente activo se exprese y se secrete *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) de acuerdo con la invención, se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, vehículos, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 Para la administración parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede formular como una solución, una suspensión, una emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (p. ej., manitol) o estabilidad química (p. ej., agentes conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por técnicas de uso general.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de la(s) proteína(s) serán una función de numerosas de variables, incluyendo la afinidad de la proteína TACI-Fc hacia su ligando, la vía de administración y el estado clínico del paciente, "cantidad terapéuticamente eficaz" es la que cuando se administra, la proteína TACI-Fc da como resultado la inhibición del ligando correspondiente. En el caso de TACI-Fc, el ligando puede ser, p. ej., Blys y/o APRIL. La dosificación administrada, como una dosis aislada o dosis múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas de la proteína TACI-Fc, la vía de administración, el estado del paciente y las características (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos, pertenecen a la capacidad de los expertos en la materia, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de su ligando del resto terapéutico en un individuo.

Las proteínas TACI-Fc purificadas se pueden utilizar en una cantidad desde aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg o desde aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o desde aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal o desde aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

En otras realizaciones preferentes, la proteína purificada TACI-Fc se administra a diario o en días alternos o tres veces a la semana o una vez por semana. Las dosis diarias se proporcionan generalmente en dosis divididas o en forma de liberación continua, eficaz para obtener los resultados deseados. La segunda administración o las posteriores se pueden realizar en una dosificación que sea la misma, menor o mayor que la dosis administrada inicial o previamente al individuo. Una segunda administración o una posterior se puede administrar durante o antes del comienzo de la enfermedad.

En una realización preferida, TACI-Fc es ataccept. El ataccept purificado se puede utilizar preferiblemente para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una variedad de enfermedades o de trastornos. Tales enfermedades o trastornos se seleccionan preferiblemente entre trastornos autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), así como para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). TACI-Fc purificada también se puede utilizar para el tratamiento del cáncer, tal como neoplasias hematológicas, tal como mieloma múltiple (MM) y/o linfoma de no-Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC) y macroglobulemia de Waldenstrom (MW).

De acuerdo con la presente invención, la proteína TACI-Fc recombinante se puede producir en sistemas de expresión eucarióticos, tales como levadura, insectos o células de mamífero, dando como resultado proteínas TACI-Fc glicosiladas. Es más preferido expresar la proteína TACI-Fc en células de mamífero, tales como líneas celulares animales, o en líneas celulares humanas. Las células de ovario de hámster chino (CHO) o a línea celular de mieloma de murino NSO, son ejemplos de líneas celulares que son particularmente adecuadas para la expresión de la proteína TACI-Fc que se va a purificar. La proteína TACI-Fc también se puede producir preferiblemente en líneas celulares humanas, tales como p. ej., la línea celular humana de fibrosarcoma HT1080, la línea celular humana de retinoblastoma PERC6 o la línea celular humana de riñón embrionario 293, o una línea celular permanente de amniocitos, tal y como se describe p. ej., en el documento EP 1230354. Si la proteína TACI-Fc que se va a purificar se expresa en células de mamífero que la secretan, el material de partida del procedimiento de purificación de la invención es el material sobrenadante del cultivo celular, también denominado recolección o recolección bruta. Si las células se cultivan en un medio que contiene suero animal, el material sobrenadante del cultivo celular también contiene proteínas séricas como impurezas.

Preferiblemente, las células que expresan y secretan la proteína TACI-Fc se cultivan bajo condiciones sin suero. La proteína TACI-Fc también se puede producir en un medio químicamente definido. En este caso, el material de partida del procedimiento de purificación de la invención, es un material sobrenadante de un cultivo celular exento de suero que contiene principalmente proteínas de la célula hospedadora como impurezas. Si se añaden factores de crecimiento al medio del cultivo celular, tal como insulina, por ejemplo, estas proteínas también se eliminarán durante el procedimiento de purificación.

Un segundo aspecto de la invención se dirige a un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína TACI-Fc que comprende las etapas de:

- a) purificar dicha proteína TACI-Fc según el procedimiento de purificación de acuerdo con la presente invención; y
- b) formular dicha proteína TACI-Fc en una composición farmacéutica,

Se describe el uso de cuerpos grasos con proteína A para purificar TACI-Fc.

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo para la purificación de TACI-Fc usando cuerpos grasos

1.1. Lavado de cuerpos grasos antes del uso

Los cuerpos grasos de StratoCapture[®] se obtuvieron de SemBioSys Genetics Inc. Los cuerpos grasos se suspendieron en primer lugar de forma uniforme en la solución que los comprendía, girando suavemente el tubo. La solución de los cuerpos grasos se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos y la fase acuosa subyacente se eliminó de la

capa de cuerpos grasos con proteína A.

Los cuerpos grasos se resuspendieron en un tampón de equilibrio de nuevo aporte que comprendía tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 pipeteando o mezclando suavemente. El volumen añadido de tampón de equilibrio era idéntico a la fase acuosa que había sido eliminada previamente. La solución de los cuerpos grasos se centrifugó a continuación a 10000 x g durante 10 minutos y la fase acuosa subyacente se eliminó de la capa de cuerpos grasos. Esta etapa de equilibrio se realizó tres veces.

1.2. Carga de los cuerpos grasos con TACI-Fc

La solución que comprendía los cuerpos grasos se añadió a una muestra que comprendía TACI-Fc sin purificar, a fin de obtener una relación final de TACI-Fc por mg en peso seco de cuerpos grasos de aproximadamente 4 mg. Una muestra que comprendía IgG1 kappa humana purificada se utilizó como testigo positivo. La solución se mezcló bien pero suavemente mediante inversión. Los tubos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos. El material sobrenadante se separó y se desechó de los cuerpos grasos usando una aguja de jeringa para empujar a través de la capa de la almohadilla adiposa.

1.3. Etapa de lavado

Los cuerpos grasos de la almohadilla adiposa se suspendieron de nuevo suavemente en un volumen de tampón de lavado que se corresponde a una o a dos veces el volumen de los cuerpos grasos de la almohadilla adiposa. El tampón de lavado comprendía tampón fosfato 25 mM a pH 7,0. El tubo se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos. La fase acuosa subyacente se retiró y se apartó de los cuerpos grasos, usando una aguja de jeringa para empujar a través de la capa de almohadilla adiposa. La fase acuosa se filtró a través de 0,2 μm y se separó en partes alícuotas. Esta etapa de lavado se realizó tres veces.

1.4. Etapa de elución

Los cuerpos grasos de la almohadilla adiposa se suspendieron de nuevo en un volumen apropiado en un volumen de tampón de elución correspondiente a una o dos veces el volumen de los cuerpos grasos de la almohadilla adiposa. El tampón de elución comprendía tampón acetato 200 mM a pH 3,5. El tubo se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos y el material sobrenadante se recogió usando una jeringa. El material sobrenadante que comprendía Taci-Fc purificada, se filtró a través de 0,2 μm y se neutralizó a pH 7,0 empleando NaOH 1 M. Esta etapa de elución se realizó tres veces.

1.5. Resultados

Los resultados se analizaron mediante electroforesis de microfluidos (sistema Caliper) y se muestran en la Figura 2. Estos resultados de la electroforesis de microfluidos muestran que TACI-Fc se puede purificar eficientemente usando el protocolo anterior.

Ejemplo 2: Determinación de la capacidad de carga óptima para Taci-Fc

La capacidad de carga de los cuerpos grasos es un parámetro importante a optimizar. Cuando se carga demasiada TACI-Fc por mg en peso seco (PS) de cuerpos grasos (CG), las proteínas TACI-Fc no se unirán a los cuerpos grasos y se perderán en el "flujo continuo", es decir, la fracción no unida de la muestra que comprende TACI-Fc. El % de TACI-Fc no unida que se pierde en el flujo continuo, se denomina el "% de avance". Por el contrario, cuando se carga poca TACI-Fc por mg de PS de CG, un elevado porcentaje de cuerpos grasos no se une a ninguna proteína TACI y esto conduce a un procedimiento poco rentable. Por lo tanto, la capacidad de carga óptima de cuerpos grasos se determinó para TACI-Fc.

La capacidad de carga de cuerpos grasos se determinó cargando cantidades crecientes de TACI-Fc sobre cuerpos grasos. Las condiciones del procedimiento se describen en el Ejemplo 1, a excepción del valor de la relación final de mg de TACI-Fc por mg de peso seco de cuerpos grasos, en el apartado 1.2. La capacidad de carga se determinó midiendo el nivel de TACI-Fc en la fracción no unida. La capacidad se expresó en mg de TACI-Fc por mg de PS de CG.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Este experimento permite concluir que:

- se puede cargar hasta aproximadamente 4 mg de TACI-Fc por mg de PS de CG cuando se trabaja con un avance del 0%;
- se puede cargar hasta aproximadamente 5 mg de TACI-Fc por mg de PS de CG cuando se trabaja con un avance del 5%; y
- se puede cargar hasta aproximadamente 5,5 mg de TACI-Fc por mg de PS de CG cuando se trabaja con un avance del 10%.

Ejemplo 3: Optimización de la etapa de la elución

La realización de la etapa de elución se exploró variando el pH del tampón de elución desde 3,9 hasta 2,5. Las condiciones del equilibrado, la carga y el lavado eran idénticas a las descritas en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Impacto del pH en la elución sobre la purificación de TACI-Fc

pH en la elución	Rendimiento [%]	% de dímeros en la elución	HCP [ppm]
3,9	41	95	15000
3,9	53	96	13000
3,0	54	92	30000
2,5	Los cuerpos grasos se solubilizaron y no se obtuvo una fase de separación		

5

Según lo ilustrado en la Tabla 5, la disminución del pH no influye en el rendimiento en la elución, pero disminuye el aclaramiento de HCP.

La Tabla 6 ilustra una comparación de los resultados de los cuerpos grasos con cromatografía de proteína A.

Tabla 6: Comparación de cuerpos grasos y cromatografía de la proteína A

Tecnología	Rendimiento [%]	% de dímeros en la carga	% de dímeros en la elución	HCP [ppm]
StratoCapture	47	76,5	96	14000
Cromatografía de proteína A	70	80,6	93	2000

10

En conclusión, el material de tipo StratoCapture mostraba un comportamiento único en términos de elución, comparado con la cromatografía de la proteína A. Por un lado, el factor de aclaramiento y el rendimiento eran más bajos que cuando se utilizaban procedimientos de cromatografía de la proteína A. Por otra parte, los cuerpos grasos mostraron una selectividad más alta hacia los dímeros de TACI-Fc (96% en la fracción de captura) que la cromatografía de la proteína A.

15

Ejemplo 4: Métodos analíticos

La concentración de TACI-Fc en la recolección clarificada se midió usando un aparato de Biacore.

El nivel de agregados en la recolección clarificada se midió usando cromatografía de exclusión por tamaño de la proteína A (PA-SEC).

20 La concentración de TACI-Fc en las fracciones posteriores a la elución y el nivel de agregados se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

El nivel de proteínas en la célula hospedadora (HCP) se midió por ELISA.

La electroforesis de microfluidos se realizó usando un sistema LabChip® de Caliper.

25 El peso seco de los cuerpos grasos se midió del modo siguiente. En primer lugar se midió el recipiente de tara. Aproximadamente 0,3 a 0,5 ml de una muestra de cuerpos grasos se colocaron en el recipiente de tara. Se midió la masa combinada del recipiente y la muestra húmeda y se registró. El recipiente de tara que contenía la muestra se colocó en un conjunto de horno para secado a $80 \pm 5^\circ\text{C}$. Después de 4 horas a 4 días, la muestra se retiró de la muestra procedente del horno, y se midió la masa combinada del recipiente de tara y la muestra seca. El recipiente de la muestra se colocó de nuevo en el horno, se coció durante otra media hora, y se pesó de nuevo. Si el peso de la muestra no variaba, la medición se correspondía con el peso seco de los cuerpos grasos. Si el peso había cambiado, la muestra se colocó de nuevo en el horno durante otros 30 minutos y se volvió a pesar. Esto se repitió hasta que el peso de la muestra no cambió.

30

Resultados globales y ventajas del procedimiento de purificación de la presente invención

35 TACI-Fc se une y se eluye de los cuerpos grasos usando las condiciones experimentales desarrolladas en el marco de la presente invención (véase el Ejemplo 1). Los mejores resultados se obtuvieron cuando:

- se cargaron 5 gramos de TACI-Fc por gramo de cuerpos grasos en peso seco (véase el Ejemplo 2); y

- los cuerpos grasos se eluyeron a un pH de aproximadamente 3,5 (véase el Ejemplo 3).

Además, los cuerpos grasos mostraron de forma asombrosa y ventajosa una mayor selectividad hacia los dímeros de TACI-Fc (96% en la fracción posterior a la captura) que la cromatografía de la proteína A (véase el Ejemplo 3).

5 El uso de la tecnología de cuerpos grasos para purificar TACI-Fc es ventajoso sobre una cromatografía clásica de la proteína A, por distintas razones.

En primer lugar, tal y como se ha mencionado anteriormente, los cuerpos grasos con proteína A mostraron una selectividad más elevada hacia los dímeros de TACI-Fc que la cromatografía clásica de la proteína A. Esto es muy ventajoso cuando TACI-Fc está destinada a la administración en humanos, puesto que (i) solamente los dímeros de TACI-Fc son farmacéuticamente activos; y (ii) los agregados de TACI-Fc muestran propiedades inmunogénicas.

10 En segundo lugar, para purificar una cantidad dada de proteína TACI-Fc, la tecnología de cuerpos grasos es mucho más barata que la tecnología de la cromatografía de la proteína A. De hecho, usando modelos de costes, se estimó que el uso de un procedimiento de purificación que implica cuerpos grasos con proteína A es ventajoso. Según un modelo de coste, el coste de la cromatografía de la proteína A se estimaba en 13 USD por gramo de TACI-Fc. En contraste con esto, el coste de la purificación de los cuerpos grasos con proteína A se estimaba en 6,75 USD por gramo de TACI-Fc.

En tercer lugar, la tecnología de cuerpos grasos se pone en práctica más fácilmente con grandes volúmenes de proteínas TACI-Fc que se van a purificar, que una cromatografía clásica. De hecho, los cuerpos grasos no son solubles en agua y la captura de las proteínas del anticuerpo empleando StratoCapture es, por lo tanto, una simple extracción de líquido/líquido, que vuelve conveniente el procedimiento.

20 En resumen, la tecnología de cuerpos grasos ofrece el potencial para transformar el procedimiento de purificación cromatográfica por tandas de anticuerpos, poco rentable y de alto gasto financiero, en un procedimiento económico, conveniente basado en cuerpos grasos con proteína A como reactivos desechables.

Referencias

- 25 1. Akerstrom, B. y Bjorck, L. (1989). "Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties". *J. Biol. Chem.* *264*, 19740-19746.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* *215*, 403-410.
3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* *25*, 3389-3402.
- 30 4. Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G. y Williamson, L. M. (1999). "Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities". *Eur. J. Immunol.* *29*, 2613-2624.
5. Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX". *Nucleic Acids Res.* *12*, 387-395.
- 35 6. Dufresne, G., Takacs, L., Heus, H.C, Codani, J.J. y Duval, M. (2002). "Patent searches for genetic sequences: how to retrieve relevant records from patented sequence databases". *Nat. Biotechnol.* *20*, 1269-1271.
7. Grantham, R. (1974). "Amino acid difference formula to help explain protein evolution". *Science* *185*, 862-864.
8. Gross, J.A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S.R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., Moore, M., Littau, A., Grossman, A., Haugen, H., Foley, K., Blumberg, H., Harrison, K., Kindsvogel, W. y Clegg, C.H. (2000). "TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease". *Nature* *404*, 995-999.
- 40 9. Hahne, M., Kataoka, T., Schroter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., Sordat, B., Rimoldi, D. y Tschopp, J. (1998). "APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth". *J. Exp. Med.* *188*, 1185-1190.
- 45 10. Hinton, P.R., Johlf, M.G., Xiong, J.M., Hanestad, K., Ong, K.C., Bullock, C, Keller, S., Tang, M.T., Tso, J.Y., Vasquez, M. y Tsurushita, N. (2004). "Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates". *J. Biol. Chem.* *279*, 6213-6216.
- 50 11. Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skelton, N.J., Kelley, R.F. y Starovasnik, M.A. (2005). "Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding". *J. Biol. Chem.* *280*, 7218-7227.
12. Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G. y Mulker-

- rin, M.G. (2000). "Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc". *J. Immunol.* **164**, 4178-4184.
13. Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M. y Mulkerrin, M.G. (2001). "Engineered antibodies with increased activity to recruit complement". *J. Immunol.* **166**, 2571-2575.
- 5 14. McBride, K.E. y Summerfelt, K.R. (1990). "Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation". *Plant Mol. Biol.* **14**, 269-276.
15. Moloney, Boothe y van Rooijen. "Oil bodies and associated proteins as affinity matrices". SemBioSys Genetics Inc. [documento de patente de EE.UU. nº 6.924.363]. 2-8-2005.
16. Moore, P.A., Belvedere, O., Orr, A., Pieri, K., LaFleur, D.W., Feng, P., Soppet, D., Charters, M., Gentz, R., Parmelee, D., Li, Y., Galperina, O., Giri, J., Roschke, V., Nardelli, B., Carrell, J., Sosnovtseva, S., Greenfield, W., Ruben, S.M., Olsen, H.S., Fikes, J. y Hubert, D.M. (1999). "BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator". *Science* **285**, 260-263.
- 10 17. Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J.A., Greipp, P.R. y Jelinek, D.F. (2004). "Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival". *Blood* **103**, 689-694.
- 15 18. Pearson, W.R. (1990). "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**, 63-98.
19. Pieper-Furst, U., Madkour, M.H., Mayer, F. y Steinbuchel, A. (1994). "Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*". *J. Bacteriol.* **176**, 4328-4337.
- 20 20. Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A. y Presta, L.G. (2001). "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R". *J. Biol. Chem.* **276**, 6591-6604.
- 25 21. Smith, T.F. y Waterman, M.S. (1981). "Identification of common molecular subsequences". *J. Mol. Biol.* **147**, 195-197.
22. Steurer, W., Nickerson, P.W., Steele, A.W., Steiger, J., Zheng, X.X. y Strom, T.B. (1995). "Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance". *J. Immunol.* **155**, 1165-1174.
23. Ting, J.T., Balsamo, R.A., Ratnayake, C. y Huang, A.H. (1997). "Oleosin of plant seed oil bodies is correctly targeted to the lipid bodies in transformed yeast". *J. Biol. Chem.* **272**, 3699-3706.
- 30 24. Vaccaro, C, Zhou, J., Ober, R.J. y Ward, E.S. (2005). "Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels". *Nat. Biotechnol.* **23**, 1283-1288.
25. van Rooijen, G.J., Terning, L.I. y Moloney, M.M. (1992). "Nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* oleosina gene". *Plant Mol. Biol.* **18**, 1177-1179.
- 35 26. von Bulow, G.U. y Bram, R.J. (1997). "NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily". *Science* **278**, 138-14.
27. Wu, Y., Bressette, D., Carrell, J.A., Kaufman, T., Feng, P., Taylor, K., Gan, Y., Cho, H. Garcia, A.D., Gollatz, E., Dimke, D., LaFleur, D., Migone, T.S., Nardelli, B., Wei, P., Ruben, S.M., Ullrich, S.J., Olsen, H.S., Kanakaraj, P., Moore, P.A. y Baker, K.P. (2000). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS". *J Biol Chem.* **275**, 35478-85.
- 40 28. Xia, X.Z., Treanor, J., Senaldi, G., Khare, S.D., Boone, T., Kelley, M., Theill, L.E., Colombero, A., Solovyev, I., Lee, F., McCabe, S., Elliott, R., Miner, K., Hawkins, N., Guo, J., Stolina, M., Yu, G., Wang, J., Delaney, J., Meng S.Y., Boyle W.J. y Hsu, H. (2000). "TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation". *J. Exp. Med.* **192**, 137-143.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LABORATORIES SERONO S.A.

<120> PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN Fc EMPLEANDO TECNOLOGÍA DE CUERPOS GRASOS

5 <130> 1156 WO/PCT

<150> EP 07101233.0

<151> 26-01-2007

<150> 60/886.681

<151> 26-01-2007

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1 5 10 15

Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
20 25 30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35 40 45

Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50 55 60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65 70 75 80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85 90 95

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
100 105 110

Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
115 120 125

ES 2 366 593 T3

Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
 130 135 140

Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
 145 150 155 160

Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
 165 170 175

Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
 180 185 190

Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
 195 200 205

Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
 225 230 235 240

Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
 245 250 255

Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
 260 265 270

His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
 275 280 285

Gly Gly Pro Gly Ala
 290

<210> 2
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> proteína de fusión TACI-Fc

<400> 2

5

10

ES 2 366 593 T3

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30

Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45

Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 55 60

Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80

Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85 90 95

Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110

Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 115 120 125

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 130 135 140

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 145 150 155 160

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 165 170 175

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 180 185 190

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 195 200 205

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 210 215 220

-

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 245 250 255

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 260 265 270

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 275 280 285

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 290 295 300

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 305 310 315 320

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 325 330 335

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

- <210> 3
- <211> 1044
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> Polinucleótido que codifica una proteína de fusión TACI-Fc

<400> 3

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggcgc cgtcttcgtt 60
 tcgctcagcc aggaaatcca tgccgagttg agacgcttcc gtagagctat gagatcctgc 120
 cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
 aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
 caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300

10

cagcacccta agcaatgtgc atactttctgt gagaacaagc tcaggagcga gcccaaatct 360
 tcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 420
 gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 480
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 540
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 600
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 660
 aagtgcaagg tctccaacia agccctccca tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc 720
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 780
 aagaaccagg tcagcctgac ctgectggtc aaaggcttct atcccagcga categcctgtg 840
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 900
 tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 960
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1020
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1044

<210> 4

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión oleosina-proteína A

<400> 4

Tyr Ala Thr Gly Glu His Pro Gln Gly Ser Asp Lys Leu Asp Ser Ala
 1 5 10 15

Arg Met Lys Leu Gly Ser Lys Ala Gln Asp Leu Lys Asp Arg Ala Gln
 20 25 30

Tyr Tyr Gly Gln Gln His Thr Gly Gly Glu His Asp Arg Asp Arg Thr
 35 40 45

Arg Gly Gly Gln His Thr Thr Leu Val Pro Arg Gly Ser Met Asp Gln
 50 55 60

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 65 70 75 80

ES 2 366 593 T3

Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 85 90 95

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe
 100 105 110

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly
 115 120 125

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu
 130 135 140

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn
 145 150 155 160

Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met
 165 170 175

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 180 185 190

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu
 195 200 205

Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 210 215 220

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
 225 230 235 240

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
 245 250 255

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
 260 265 270

Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu
 275 280 285

Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile

ES 2 366 593 T3

290

295

300

Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Gly Asn Ser Arg Gly Ser Val Asp Leu
305 310 315 320

Gln Ile Thr Asn

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para purificar una proteína TACI-Fc, que comprende las etapas de:
- 5 a) mezclar una solución que comprende cuerpos grasos asociados a una proteína A con una muestra que comprende dicha proteína TACI-Fc a fin de obtener una relación final en mg de proteína TACI-Fc por mg de peso seco de cuerpos grasos, dentro de un intervalo desde 1 hasta de 5,5; y
- b) separar dichos cuerpos grasos con proteína A de dicha proteína TACI-Fc añadiendo una solución acuosa que tiene un pH comprendido dentro de un intervalo de 3,5 a 3,9,
- en donde la solución que comprende TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b), comprende más de 93%, 94%, 95% o 96% de dímeros de TACI-Fc.
- 10 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína TACI-Fc presenta una secuencia idéntica, en al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a SEQ ID NO: 2, preferentemente en donde dicha proteína TACI-Fc tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- 15 3.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente la etapa de lavado de dichos cuerpos grasos con proteína A antes de realizar la etapa (a), y/o que comprende adicionalmente la etapa de lavado de dichos cuerpos grasos con proteína A entre la etapa (a) y la etapa (b).
- 4.- El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los cuerpos grasos con proteína A se lavan con un tampón fosfato a un pH de 7.
- 5.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde dicha etapa de lavado de dichos cuerpos grasos con proteína A se repite dos o tres veces.
- 20 6.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha relación final de mg de proteína TACI-Fc por mg en peso seco de cuerpos grasos de la etapa (a), está dentro del intervalo de 3,5 a 5.
- 7.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa (b) se realiza añadiendo una solución acuosa que tiene un pH de 3,5.
- 8.- El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha solución acuosa comprende acetato 200 mM.
- 25 9.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa (b) se repite dos o tres veces.
- 10.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una etapa (c) de filtración de la solución que comprende dicha proteína TACI-Fc obtenida al final de la etapa (b).
- 30 11.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una etapa (d) de neutralización de la solución obtenida al final de la etapa (c).
- 12.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una o varias etapas de pulido.
- 13.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína TACI-Fc se formula adicionalmente en una composición farmacéutica.

Figura 1A

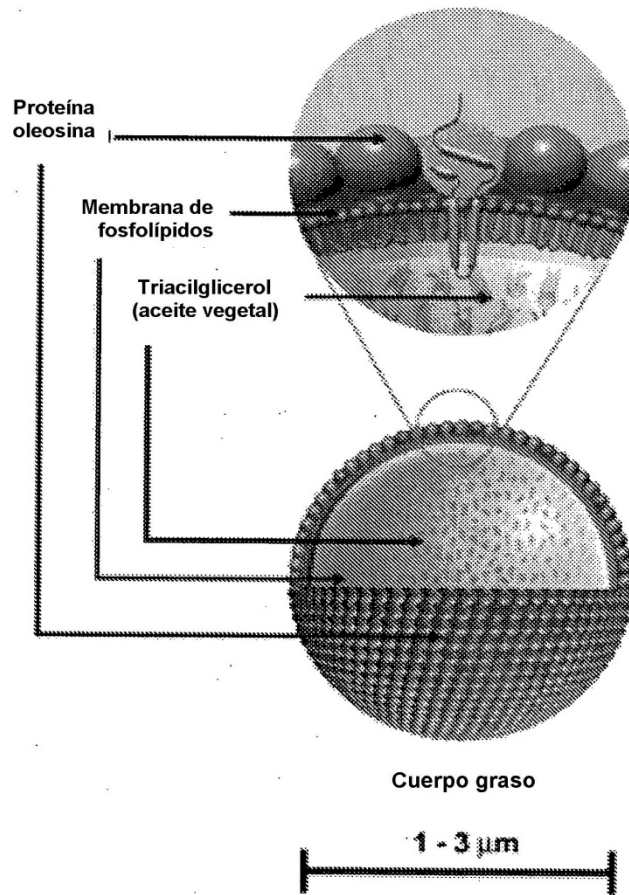


Figura 1B

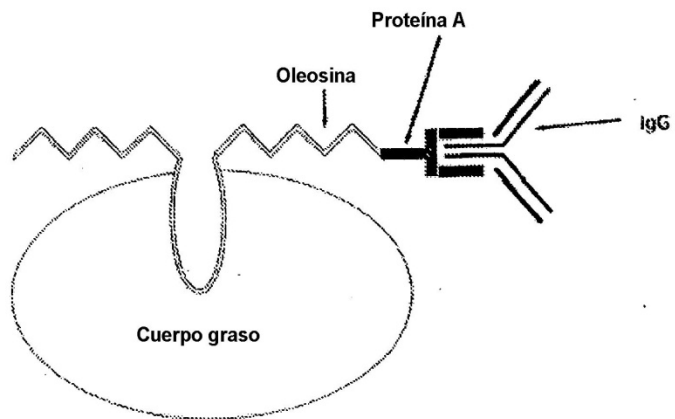


Figura 2

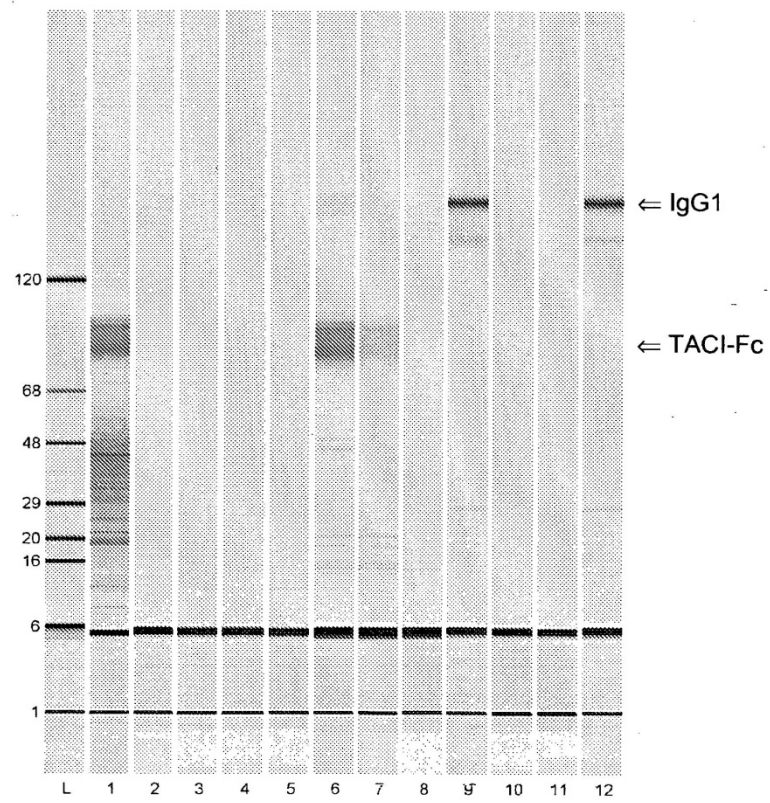


Figura 3

