

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 375 831**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 1/22**  
(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06763598 .7**

(96) Fecha de presentación: **08.06.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1891088**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

(54)

Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-18.**

(30)

Prioridad:  
10.06.2005 EP 05105124  
14.06.2005 US 690414 P

(73)

Titular/es:  
**ARES TRADING S.A.  
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ  
1170 AUBONNE, CH**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.03.2012**

(72)

Inventor/es:  
**LE STRAT, Claire;  
MEUWLY, Frederic;  
WENGER, Pierre;  
VALAX, Pascal;  
BAER, Gianni y  
KORNMANN, Henri**

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.03.2012**

(74)

Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 831 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

Procedimiento para la purificación de proteínas de unión a IL-18

### Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, se refiere a la purificación de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) mediante cromatografía de afinidad. Específicamente, la invención comprende el uso de un ligando sintético en la cromatografía de afinidad.

### Antecedentes de la invención

Las proteínas han llegado a ser comercialmente importantes como fármacos que generalmente se denominan también "biológicos". Uno de los más grandes retos es el desarrollo de procedimientos eficientes y rentables para la purificación de proteínas a escala comercial. Ahora hay disponibles muchos métodos para la preparación a gran escala de las proteínas. Sin embargo, los productos crudos, contienen también mezclas complejas de impurezas, que a veces son difíciles de separar del producto deseado.

Las autoridades sanitarias requieren altos estándares de pureza para las proteínas destinadas a la administración a seres humanos. En adición, muchos métodos de purificación pueden contener etapas que requieren la aplicación de bajo o alto pH, altas concentraciones de sal u otras condiciones extremas que pueden poner en peligro la actividad biológica de una proteína dada. Por lo tanto, es un reto establecer un procedimiento de purificación para cualquier proteína que proporcione la suficiente pureza a la vez que retenga la actividad biológica de la proteína.

La cromatografía es una técnica de purificación apropiada porque permite la separación de moléculas que tienen propiedades físico-químicas similares. De los diferentes tipos de cromatografía, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de afinidad son las usadas más habitualmente en los procedimientos industriales.

Los sistemas cromatográficos de intercambio iónico han sido usados ampliamente para la separación de proteínas basándose principalmente en las diferencias de carga. En la cromatografía de intercambio iónico, los parches con carga sobre la superficie del soluto se atraen por cargas opuestas unidas a una matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón que los rodea sea baja. La elución se lleva a cabo generalmente aumentando la fuerza iónica (esto es, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios con carga de la matriz de intercambio iónico. Otra forma de llevar a cabo la elución del soluto es cambiar el pH y de este modo alterar la carga del soluto. El cambio en la conductividad o en el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o en etapas (elución en etapas).

Los intercambiadores aniónicos se pueden clasificar como débiles o fuertes. El grupo de carga sobre un intercambiador aniónico débil es una base débil, que se convierte en des-protonada y, por tanto, pierde su carga a pH alto. La DEAE-celulosa es un ejemplo de un intercambiador aniónico débil, en el que el grupo amino puede estar cargado positivamente por debajo de pH ~9 y pierde gradualmente su carga a valores más altos de pH. El dietilaminoetilo (DEAE) o dietil-(2-hidroxi-propil)aminoetilo (QAE) tienen cloruro como contraión, por ejemplo.

Un intercambiador aniónico fuerte, por otro lado, contiene una base fuerte, que permanece cargada positivamente a lo largo del intervalo de pH que se usa normalmente para la cromatografía de intercambio iónico (pH 1-14). La Q-sefarosa (Q significa amonio cuaternario) es un ejemplo de un intercambiador aniónico fuerte.

Los intercambiadores catiónicos se pueden clasificar también como débiles o fuertes. Un intercambiador catiónico fuerte contiene un ácido fuerte (tal como un grupo sulfopropilo) que permanece cargado a pH 1-14; mientras que un intercambiador catiónico débil contiene un ácido débil (tal como un grupo carboximetilo), que pierde gradualmente su carga cuando el pH decrece por debajo de 4 o 5. El carboximetilo (CM) y el sulfopropilo (SP) tienen sodio como contraión, por ejemplo.

Los sistemas cromatográficos que tienen una fase estacionaria hidrófoba han sido también empleados ampliamente en la purificación de proteínas. Se incluyen en esta categoría la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y la cromatografía de líquidos de fase inversa (RPLC). La base físicoquímica para la separación por HIC y por RPLC es el efecto hidrófobo, las proteínas se separan en una fase estacionaria hidrófoba basándose en diferencias de hidrofobicidad.

En la HIC, generalmente, se cargan sobre la columna de HIC las moléculas de la muestra en un tampón fuertemente salino. La sal del tampón interactúa con las moléculas de agua para reducir la solvatación de las moléculas en solución, exponiendo de este modo las regiones hidrófobas de las moléculas de la muestra, que son consecuentemente adsorbidas por la columna de HIC. Cuanto más hidrófoba es la molécula, menos sal se necesita para promover la unión. Habitualmente, se usa un gradiente decreciente en sal para eluir las muestras de la columna. Cuando la fuerza iónica disminuye, la exposición de las regiones hidrófilas de las moléculas aumenta y las moléculas se eluyen de la columna en orden creciente de hidrofobicidad. También se puede llevar a cabo la elución

de la muestra por la adición de modificadores orgánicos o detergentes suaves para el tampón de elución. La HIC está resumida por ejemplo en Protein Purification, 2d Ed., Springer-Verlag, New York, pgs 176-179 (1988).

En la HIC, hay disponibles diferentes soportes cromatográficos que llevan varios ligandos. Los ligandos se diferencian por su hidrofobicidad. Los ligandos hidrófobos usados comúnmente son restos fenilo, butilo u octilo.

- 5 La cromatografía de fase inversa es un método de purificación de proteínas muy relacionado con la HIC, ya que se basan ambas en las interacciones entre los grupos no polares accesibles al disolvente sobre la superficie de biomoléculas y los ligandos hidrófobos de la matriz. Sin embargo, los ligandos usados en la cromatografía de fase inversa están más altamente sustituidos con ligandos hidrófobos que los ligandos de la HIC. Aunque el grado de sustitución de los adsorbentes de HIC puede estar en el intervalo de 10-50 µmoles/mL de ligandos arilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> de la matriz, normalmente se usan varios cientos de µmoles/mL de ligandos alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> de la matriz para los adsorbentes de la cromatografía de fase inversa.

10 La cromatografía de interacción hidrófoba y la cromatografía de fase inversa se distinguen también porque la cromatografía de interacción hidrófoba se realiza en condiciones de disolvente acuoso y los cambios de fuerza iónica se utilizan para eluir la columna. La proteína se une típicamente en el estado nativo mediante grupos hidrófobos localizados en la superficie de la proteína, y el estado nativo se mantiene durante las condiciones de elución. Por contraste a esto, la cromatografía de fase inversa utiliza un disolvente hidrófobo (típicamente acetonitrilo) y la unión de un ligando es una función del reparto de fases entre la naturaleza hidrófoba del disolvente y el grupo funcional de la columna. Las proteínas se desnaturizan típicamente hasta cierto grado en tales disolventes y se unen debido a la naturaleza hidrófoba de la secuencia de polipéptido completa. Puesto que la mayoría de los grupos hidrófobos están localizados en el núcleo de las proteínas globulares, la unión se relaciona con el grado de desnaturización de la proteína y la accesibilidad de estos grupos a los grupos funcionales de la columna.

15 Entre las diferentes técnicas de purificación de proteínas, la cromatografía de afinidad merece particular atención. Dicha cromatografía cumple el requerimiento de selectividad extremadamente alta de la proteína objetivo a partir de mezclas complejas de impurezas, proporcionando de este modo un producto de mejor calidad.

20 La cromatografía de afinidad se basa en las funciones biológicas de una proteína para unirse a un ligando, esto es, un componente específico, tal como iones metálicos, péptidos, moléculas químicas, proteínas, ácidos nucleicos, que se une a la matriz de una columna. Este ligando puede estar inmovilizado o unido a una variedad de matrices, tales como celulosa o agarosa. La proteína objetivo se pasa entonces a través de la columna y se une a ella mediante el ligando, mientras que las otras proteínas se separan por elución. La purificación de una proteína objetivo se realiza usualmente pasando una solución que contiene la proteína objetivo a través de la columna que presenta una alta cantidad de ligandos unidos o inmovilizados. Este es un método de purificación muy eficiente porque se basa en la especificidad biológica de la proteína objetivo, tal como la afinidad de una enzima por un substrato.

25 Sin embargo, la variedad de ligandos disponibles que se pueden unir a una matriz es enorme y la selección del ligando óptimo no se puede deducir fácilmente de una proteína a otra. Al menos tres factores limitantes entran en juego, especialmente la diferente afinidad de las proteínas para ciertos ligandos, la inmovilización del ligando sobre la matriz en una cantidad suficientemente alta y la accesibilidad potencialmente restringida del ligando para los sitios de unión de la proteína. Por lo tanto, es extremadamente difícil establecer a priori, qué matriz de cromatografía de afinidad se unirá a la proteína objetivo.

30 40 La proteína de unión a la interleucina-18 (IL-18BP) es una proteína soluble presente en la naturaleza que fue inicialmente purificada por afinidad, sobre una columna de IL-18, procedente de la orina (Novick *et al.* 1999). La IL-18BP suprime la inducción por IL-18 del IFN-γ y la activación por IL-18 del NF-κB *in vitro*. En adición, la IL-18BP inhibe la inducción del IFN-γ en ratones inyectados con LPS (lipopolisacárido).

45 50 55 El gen de IL-18BP fue localizado en el cromosoma humano 11, y no se pudo encontrar ningún exón que codifique un dominio transmembranal en la secuencia genómica de 8,3 kb que comprende el gen de IL-18BP. Se han identificado en los seres humanos hasta ahora cuatro isoformas de IL-18BP generadas por corte y empalme alternativo de mRNA. Ellas fueron designadas IL-18BP a, b, c, y d, comparten todas el mismo N-terminal y se diferencian en el C-terminal (Novick *et al.* 1999). Estas isoformas varían en su capacidad para unirse a la IL-18 (Kim *et al.* 2000). Dentro de las cuatro isoformas humanas de IL-18BP (hIL-18BP), se sabe que las isoformas a y c tienen una capacidad neutralizante de la IL-18. La isoforma más abundante de IL-18BP, isoforma a, presenta una alta afinidad para IL-18 con una rápida velocidad de entrada y una lenta velocidad de salida, y una constante de disociación (Kd) de aproximadamente 0,4 nM (Kim *et al.* 2000). La IL-18BP se expresa constitutivamente en el bazo, y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los restos implicados en la interacción de IL-18 con IL-18BP han sido descritos mediante el uso de modelado por ordenador (Kim *et al.* 2000) y se basan en la interacción entre la proteína similar IL-1β con el IL-1R tipo I (Vigers *et al.* 1997).

La IL-18BP está constitutivamente presente en muchas células (Puren *et al.* 1999) y circula en los seres humanos sanos (Urushihara *et al.* 2000), representando un fenómeno único en la biología de las citocinas. Debido a la alta afinidad de la IL-18BP para la IL-18 (Kd = 0,4 nM) así como la alta concentración de IL-18BP encontrada en la circulación (exceso de 20 veces molar sobre la IL-18), se ha considerado que la mayor parte de las moléculas de IL-

18 en la circulación, si no todas, están unidas a IL-18BP. Por lo tanto, la IL-18BP circulante que compite por la IL-18 con los receptores de la superficie celular, puede actuar como un antiinflamatorio natural y una molécula inmunodepresora.

5 Se ha sugerido que la IL-18BP es una proteína terapéutica en muchas enfermedades y trastornos, tales como psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriásica, lesiones hepáticas, sepsis, ateroesclerosis, cardiopatías isquémicas, alergias, etc., véanse por ejemplo los documentos WO 99/09063, WO 01/07480, WO 01/62285, WO 01/85201, WO 02/060479, WO 02/096456, WO 03/080104, WO 02/092008, WO 02/101049, WO 10 03/013577. Dado que la IL-18BP se ha propuesto como una proteína terapéutica para administración por ejemplo a los seres humanos, está pendiente la necesidad de cantidades adecuadas de IL-18BP con una pureza suficientemente alta.

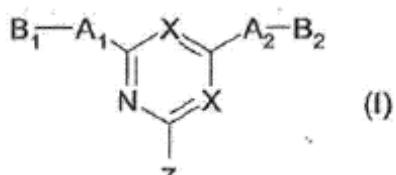
En el documento WO 2005/049649 se ha descrito un procedimiento de purificación para la IL-18BP. Sin embargo, este procedimiento no comprende ninguna etapa de cromatografía de afinidad.

Por lo tanto, es deseable un procedimiento de purificación alternativo que produzca una IL-18BP con buena pureza y alto rendimiento.

## 15 Sumario de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento de purificación para proteínas, en particular la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere al uso de ligandos sintéticos de la cromatografía de afinidad según la fórmula (I)



20 en la que A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, X y Z se definen como se describe en la descripción que se detalla a continuación, para la producción de IL-18BP purificada.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) purificada a partir de un fluido, que comprende una etapa de cromatografía de afinidad utilizando un ligando sintético según la fórmula (I), que está unido a una matriz.

## Breve descripción de los dibujos

- Fig. 1 Presenta un perfil de elución típico utilizando el ligando de afinidad nº 5. F7 - no unido; 2,3 - elución; 4 - cola de elución; F8 - banda.
- Fig. 2 Presenta recuperaciones y purezas de fracciones procedentes de determinaciones de cromatografía de afinidad con los ligandos de afinidad nº 2, nº 5, nº 6 y nº 7. NB = fracción no unida, E = eluato, ET = cola de elución.
- Fig. 3 Presenta la influencia de diferentes tampones de lavado y de elución sobre los rendimientos para la proteína IL-18BP total recuperada, su forma monomérica y su forma dimérica. La purificación se llevó a cabo con el ligando de afinidad nº 6. EG = etilenglicol, PEG = propilenglicol, NB = fracción no unida; n.d. = no determinado. El valor de "Recuperación" se calcula como sigue: (IL18BP (g) en la fracción de elución)/(IL18BP total (g) cargada en la columna).

## Descripción detallada de la invención

Los siguientes párrafos proporcionan definiciones de los diferentes restos químicos que forman los compuestos según la invención y se pretende que se apliquen uniformemente a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones a menos que se indique expresamente una definición distinta que proporcione una definición más amplia.

"Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen 1 a 6 átomos de carbono. Son ejemplos de este término grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, n-hexilo y similares.

"Arilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un único anillo (por ejemplo fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo naftilo). Los arilo preferidos incluyen fenilo, naftilo, fenantrenilo y similares. El anillo arilo puede estar también condensado con un grupo heterocicloalquilo. Tales arilos condensados incluyen dihidrobencimidazol-2-ona, benzo[1,3]dioxol y similares.

"Alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" se refiere a grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que tienen un sustituyente arilo, tal como, por ejemplo, bencilo, fenetilo y similares.

"Heteroarilo" se refiere a un grupo heteroaromático monocíclico o a un grupo heteroaromático de anillos condensados, bicíclico o tricíclico. Los ejemplos particulares de grupos heteroaromáticos incluyen piridilo opcionalmente sustituido, pirrolilo, pirimidinilo, furilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,3,5-triazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,2,3-triazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,3,4-tiadiazolilo, benzofurilo, isobenzofurilo, benzotienilo, benzotriazolilo, isobenzotienilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolizinilo, quinazolinilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, cinnolinilo, naftiridinilo, piridazinilo, pirido[3,4-b]piridilo, pirido[3,2-b]piridilo, pirido[4,3-b]piridilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinolilo, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolilo, purinilo, pteridinilo, carbazolilo, xantenilo o benzoquinolilo y similares.

"Alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a grupos alquenilo que tienen preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen uno o más sitios de insaturación de alquenilo. Los grupos alquenilo preferidos incluyen etenilo (-CH=CH<sub>2</sub>), n-2-propenilo (alilo, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>) y similares.

15 "Alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a grupos alquinilo que tienen preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen uno o más sitios de insaturación de alquinilo. Los grupos alquinilo preferidos incluyen etinilo (-C≡CH), propinilo (-CH<sub>2</sub>C≡CH), y similares.

"Acilo" se refiere al grupo -C(O)R en el que R incluye "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "arilo", "heteroarilo", "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo".

20 "Aciloxi" se refiere al grupo -OC(O)R en el que R incluye "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "arilo", "heteroarilo", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo".

"Alcoxi" se refiere al grupo -O-R en el que R incluye "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" o "arilo" o "heteroarilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo". Los grupos alcoxi preferidos incluyen a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, fenoxy y similares.

25 "Aloxicarbonilo" se refiere al grupo -C(O)OR en el que R incluye "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" o "arilo" o "heteroarilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo".

"Aminocarbonilo" se refiere al grupo -C(O)NRR' en el que cada R, R' incluye independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o arilo o heteroarilo o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo".

"Acilamino" se refiere al grupo -NR(CO)R' en el que cada R, R' es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o arilo o heteroarilo o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo".

30 "Halógeno" se refiere a átomos de fluoro, cloro, bromo y yodo.

"Sulfonilo" se refiere al grupo "-SO<sub>2</sub>-R" en el que R se selecciona de H, "arilo", "heteroarilo", "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" sustituido con halógenos, por ejemplo, un grupo -SO<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>, "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heterocicloalquilo".

35 "Sulfanilo" se refiere a grupos -S-R en el que R incluye H, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" opcionalmente sustituido con halógenos, por ejemplo, un grupo -S-CF<sub>3</sub>, "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo arilo" o "Amino" se refiere al grupo -NRR' en el que cada R, R' es independientemente hidrógeno, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo", "alquenil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heterocicloalquilo", y en el que R y R', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, pueden formar opcionalmente un anillo heterocicloalquilo de 3-8 miembros.

40 "Amina" se refiere a un grupo con la estructura -NRR', en el que R y R' incluyen hidrógeno, o "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo" o "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo", "alquenil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heterocicloalquilo", y en el que R y R', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, pueden formar opcionalmente un anillo heterocicloalquilo de 3-8 miembros.

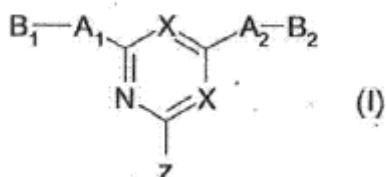
45 "Éter" se refiere a un grupo con la estructura -O-. "Tioéster" se refiere a un grupo con la estructura -S-.

50 "Sustituido o insustituido", a menos que se diga otra cosa en la definición del sustituyente individual, los grupos indicados antes, como los grupos "alquilo", "alquenilo", "alquinilo", "alcoxi", "arilo" y "heteroarilo" etc. pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo", "alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-heteroarilo", "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", grupos amino primarios, secundarios o

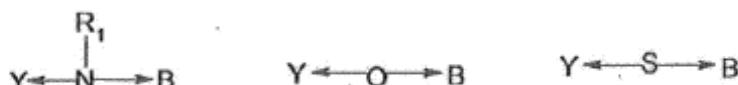
terciarios o restos de amonio cuaternario, "acilo", "aciloxi", "acilamino", "aminocarbonilo", "alcoxicarbonilo", "arilo", "ariloxi", "heteroarilo", "heteroariloxi", carboxilo, ciano, halógeno, hidroxi, sulfanilo, nitro, sulfoxi, sulfonilo, sulfonamida, alcoxi, tioalcoxi, trihalometilo y similares. Dentro del marco de esta invención, dicha "sustitución" significa que comprende también situaciones en las que los sustituyentes vecinos sufren el cierre del anillo, en particular cuando están implicados sustituyentes funcionales próximos, formando de este modo por ejemplo lactamas, lactonas, anhídridos cílicos, pero también acetales, tioacetales, aminas formados por cierre del anillo por ejemplo en un esfuerzo para obtener un grupo protector.

La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento de purificación de la IL-18BP que da como resultado la IL-18BP purificada.

- 10 En un primer aspecto la invención se refiere al uso de un ligando de la cromatografía de afinidad sintético según la fórmula (I)



en la que  $A_1$  y  $A_2$  se seleccionan del grupo que consiste en una amina, éter y tioéter de las estructuras:



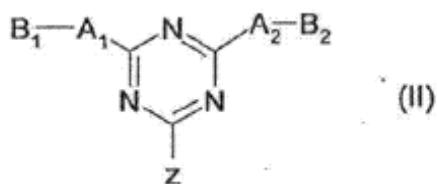
- 15 en las que  $R_1$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo sustituido o insustituido;  
 $B_1$  y  $B_2$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o insustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido o insustituido y arilo sustituido o insustituido, donde dichos  $B_1$  y  $B_2$  están, independientemente, opcionalmente sustituidos con R<sub>2</sub>, OR<sub>2</sub>, SR<sub>2</sub>, o N(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; en los que  
20 cada R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo sustituido o insustituido;  
cada X representa independientemente un nitrógeno, un carbono que lleva un hidrógeno, un carbono que lleva un grupo cloro o un carbono que lleva un grupo ciano; y  
25 Z es un grupo funcional capaz de reacción con una matriz,  
para la producción de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) purificada.

En una realización adicional, el ligando de la cromatografía de afinidad según la fórmula (I) se puede usar para la producción de proteínas purificadas.

- El término "matriz", como se usa aquí, se refiere a cualquier matriz o material de soporte usado en cromatografía, tal como las matrices basadas en polisacáridos (por ejemplo agarosa, sefarosa, dextrano, sefadex), matrices de base sintética (por ejemplo metacrilato, poliestireno, divinilbenceno) o matrices basadas en minerales (por ejemplo cerámica, sílice). Los materiales de la matriz pueden estar presentes en formas reticuladas, dependiendo del material específico. El material se puede usar como perlas. El volumen de la resina, así como la longitud y el diámetro de la columna a utilizar depende de varios parámetros tales como el volumen de fluido a tratar, la concentración de proteína en el fluido a ser sometida al procedimiento de la invención, etc., y la determinación de esto está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica.

El grupo funcional Z es cualquier grupo capaz de formar un enlace entre el ligando y la matriz, seleccionado de amina, azida, hidroxi. Z puede ser también un grupo funcional unido a la matriz, seleccionado de una amina o agarosa activada por amina que reacciona directamente con el ligando.

- 40 En una realización preferida la invención se refiere al uso de un ligando de cromatografía de afinidad sintético según la fórmula (II)



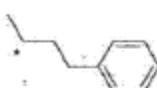
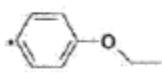
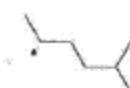
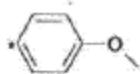
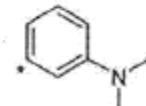
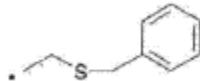
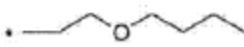
en la que  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$ ,  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$  y  $\text{Z}$  se definen como anteriormente, para la producción de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) purificada.

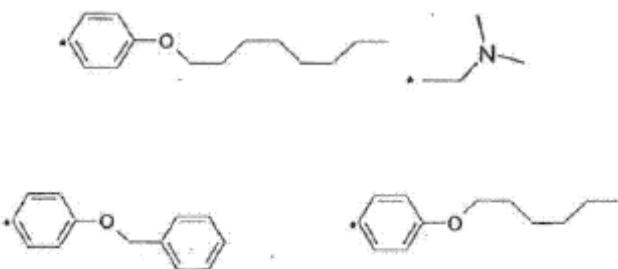
En otra realización,  $\text{A}_1$  y  $\text{A}_2$  son una amina.

- 5 En otra realización,  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  y arilo; donde dichos  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$  están, independientemente, opcionalmente sustituidos con  $\text{R}_2$ ,  $\text{OR}_2$ ,  $\text{SR}_2$ , o  $\text{N}(\text{R}_2)_2$ ; y

cada  $\text{R}_2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo y alquil  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -arilo.

- 10 En una realización preferida,  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$  o dichos  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$  sustituidos, se seleccionan independientemente del grupo de:





en las que "\*" se refiere a la posición en la que B se conecta con A.

En una realización  $B_1$  y  $B_2$  son idénticos.

En una realización preferida,  $B_1$  y  $B_2$  son n-hexilo.

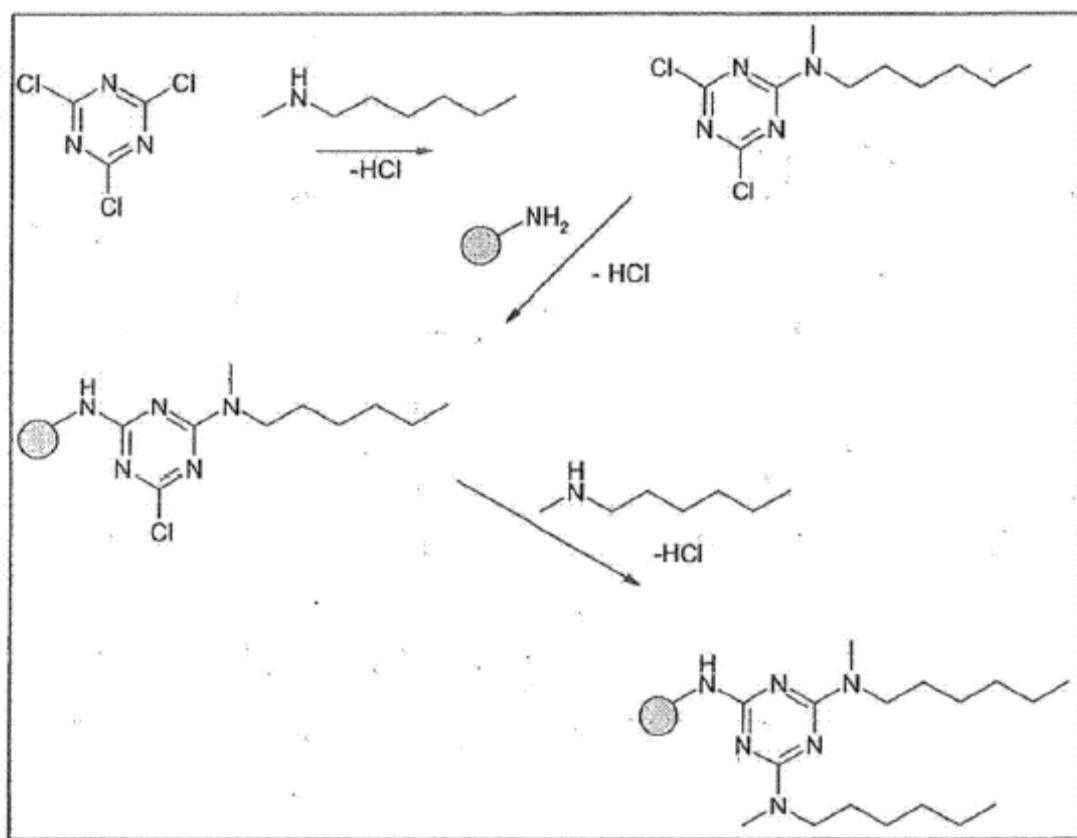
- 5 En otra realización preferida,  $A_1$  y  $A_2$  son una amina, con la estructura  $-\text{N}(\text{CH}_3)-$ .

En una realización preferida cada X es nitrógeno.

En otra realización preferida Z es NH.

Hay varias rutas potenciales para la inmovilización del ligando a la matriz. Una ruta potencial que empieza con la reacción de triclorotriazina con una amina se representa en el esquema 1:

- 10 Esquema 1:



Otra ruta empieza con la unión de la triclorotriazina a la matriz activada por una amina, seguida por la reacción con la amina. Una tercera ruta debería ser la unión de dos aminas a la triclorotriazina seguida por la unión de la clorotriazina sustituida a una matriz activada por una amina. Estas rutas generales se pueden aplicar a una variedad de protocolos conocidos por los expertos en la técnica.

- 15 La matriz activada por una amina se puede preparar por aminación de cualquier material de matriz comercial o se puede comprar de fuentes comerciales. Se pueden insertar espaciadores de diferente longitud entre la matriz y el

grupo funcional o entre el grupo funcional y el ligando mediante reacción de reactivos bifuncionales como la etilendiamina, propilendiamina o similares con el material de la matriz, o el ligando o introduciendo los espaciadores.

En una realización preferida el grupo funcional se une directamente a la matriz sin ningún espaciador.

En una realización la densidad del ligando de afinidad de la columna está entre 5 µmol/g-55 µmol/g.

5 En otra realización, la densidad del ligando de afinidad es 10, 20, 30, 40 o 50 µmol/g.

En una realización preferida, la densidad del ligando de afinidad es 20 µmol/g de resina.

En una realización preferida el ligando de afinidad como se ha definido antes se usa para la producción de IL-18BP recombinante humana, purificada.

10 En otra realización preferida, el ligando de afinidad se usa para la producción de IL-18BP a partir del sobrenadante de cultivo celular exento de suero.

En otra realización, el ligando de afinidad se usa para la captura de IL-18BP a partir de un fluido.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de proteínas purificadas, específicamente la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) que comprende someter un fluido a cromatografía de afinidad, que utiliza el ligando de afinidad como se ha descrito anteriormente.

15 En una realización, el procedimiento se lleva a cabo a temperatura entre 4-37 °C.

En una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (16-25 °C).

En una realización, el procedimiento recupera más del 40 % o más del 50 % de IL-18BP pura después de cromatografía de afinidad.

20 En una realización preferida, el procedimiento produce IL-18BP pura en >60 % o >70 % o >80 % después de cromatografía de afinidad.

En una realización preferida, el procedimiento produce IL-18BP pura, en la que el porcentaje de IL-18BP monómero es mayor del 80 %. Donde, pura se refiere a una pureza superior al 95 % cuando se determina por análisis de Bradford o con menos de 100,000 ppm de proteínas de la célula hospedante (HCP) medidas por ELISA.

25 En otra realización preferida, el porcentaje de IL-18BP monómero es al menos del 95 % o incluso más alto del 95 % después de la etapa de cromatografía de afinidad.

En una realización, el procedimiento comprende además una o más etapas adicionales de cromatografía seleccionadas del grupo que consiste en cromatografía de inducción-carga hidrófoba (por ejemplo 4-mercaptopirolidina (MEP) como ligando inmovilizado), cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (por ejemplo sobre una sefarosa quelante), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo una resina de carboximetilo (CM), tal como CM sefarosa FF), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo sobre una resina de fenilo, tal como fenil-sefarosa FF), y cromatografía de fase inversa, por ejemplo sobre columna de RPC Source 30 de fase inversa.

30 Es particularmente preferido usar la etapa de purificación que comprende el ligando de afinidad de la invención en combinación con una cualquiera de las etapas de cromatografía mencionadas antes o en cualquier combinación entre ellas. Preferiblemente, se usa la cromatografía de afinidad para la captura de IL-18PB a partir de un fluido tal como por ejemplo la cosecha del cultivo celular.

Más preferiblemente, la cromatografía de afinidad va seguida por las siguientes etapas de purificación adicionales:

a) Someter el eluato de la cromatografía de afinidad a cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados;

40 b) Someter el eluato de la cromatografía de afinidad de iones metálicos a cromatografía de interacción-carga hidrófoba;

c) Someter el eluato de la cromatografía de interacción-carga hidrófoba a cromatografía de intercambio catiónico;

(d) Someter el flujo de salida de la cromatografía de intercambio catiónico a cromatografía de interacción hidrófoba;

45 e) Someter el eluato de la cromatografía de interacción hidrófoba a cromatografía de fase inversa.

La etapa (a) se lleva a cabo preferiblemente en una columna de sefarosa quelante, tal como una columna de sefarosa quelante de caudal rápido, que tiene iones Zn<sup>2+</sup> quelados. Preferiblemente, la unión de IL-18BP se realiza a pH 8,5 ± 0,1, preferiblemente en fosfato de sodio 50 mM y NaCl 0,5 M que tiene este pH. Se puede realizar una etapa de lavado con cloruro de amonio 15 mM en tampón de equilibrio. La elución se realiza preferiblemente a pH

50 9,0 ± 0,5, por ejemplo a pH 8,7 o a pH 9, por ejemplo en acetato de amonio 0,075 M o en acetato de amonio 0,06 M que tienen este pH.

La etapa (b) se lleva a cabo preferiblemente en una columna MEP (derivado de 4-mercaptopoetilpiridina), tal como MEP HyperCel® (LifeSciences). La unión de IL-18BP se realiza preferiblemente a pH  $6,1 \pm 0,1$ , por ejemplo en PBS 1X+ NaCl 1 que tiene este pH. La elución se realiza preferiblemente a pH  $8,4 \pm 0,1$ , por ejemplo en tampón de fosfato 20 mM más propilenglicol al 35 %, cuya mezcla tiene pH  $8,4 \pm 0,1$ .

- 5 La etapa (c) se lleva a cabo preferiblemente en una columna de carboximetil-sefarosa (CM). Esta es una etapa en la que se recoge el flujo de salida para posterior purificación. Esta etapa se basa en el hecho de que en circunstancias específicas referidas por ejemplo a las condiciones de sal y de pH, la IL-18BP no se une a la resina que se usa para unirse a ella, cuando hay impurezas (por ejemplo proteínas de la célula hospedante, proteínas derivadas del suero). Preferiblemente, la etapa (c) se lleva a cabo a pH  $6,0 \pm 0,2$ , por ejemplo en presencia de MES (ácido N-morfolinoetanosulfónico 1 mM).

- 10 La etapa (d) se lleva a cabo preferiblemente en una columna de fenil-sefarosa, tal como una columna Fenil-Sefarosa Fast Flow. Preferiblemente, la unión de IL-18BP se realiza a aproximadamente pH  $9,1 \pm 0,2$ , por ejemplo en borato de sodio 50 mM y sulfato de amonio 0,9 M o sulfato de amonio 0,10 M que tienen este pH. La elución desde la columna de fenil-sefarosa se realiza preferiblemente a pH  $9,1 \pm 0,2$  en presencia de una concentración elevada de sal, tal como en borato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,15 M que tienen este pH.

- 15 La etapa (e) se lleva a cabo preferiblemente en una columna de RPC Source 30. La unión de IL-18BP al material de la columna se realiza preferiblemente a pH  $9,1 \pm 0,2$ , por ejemplo en tampón de borato de sodio 50 mM. La elución se realiza preferiblemente usando un gradiente, eluyendo la IL-18BP en alrededor de 28-32 % de ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA) en acetonitrilo.

- 20 Se entiende que las condiciones descritas antes en conexión con las etapas (a) a (e) de la purificación se pueden aplicar también cuando se llevan a cabo etapas individuales de la invención, o (sub-)combinaciones de etapas.

En otra realización, el procedimiento comprende además una o más etapas de filtración para separación de virus.

En otra realización, el procedimiento para la producción de IL-18BP purificada a partir de IL-18BP produce IL-18BP recombinante, humana.

- 25 En otra realización, el procedimiento empieza con un fluido, en el que el fluido es el sobrenadante de cultivo celular exento de suero.

Se pueden cambiar varios parámetros del procedimiento de purificación para mejorar la capacidad de unión de la columna de afinidad y la selectividad de purificación de IL-18BP (por ejemplo temperatura, pH, concentración de sal del tampón de equilibrio, tampón de carga y/o tampón de elución).

- 30 En una realización, el tampón de equilibrio es PBS pH 7,0.

En otra realización, el tampón de equilibrio es tampón de fosfato de sodio con un pH entre 5,5-7,0.

En otra realización, el tampón de equilibrio de fosfato de sodio comprende adicionalmente  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

En una realización, la columna de afinidad se carga con un fluido que comprende la IL-18BP, con lo que el fluido se aplica sobre la columna en una mezcla de tampón de fosfato de sodio y sulfato de sodio con un pH entre 5,5-7,0.

- 35 En una realización preferida el pH del tampón de carga es 5,5.

En una realización, el tampón comprende además  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , para aumentar adicionalmente la capacidad de unión.

En otra realización, el fluido comprende la cosecha del biorreactor clarificada.

En una realización, la columna de afinidad se lava con tampón seleccionado del grupo de fosfato de sodio, sulfato de sodio y PBS a pH 7,0, para separar las proteínas unidas inespecíficamente después de cargar el fluido que comprende la IL-18BP a la columna de afinidad.

En otra realización el tampón de lavado comprende además  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

En una realización, la elución de IL-18BP se realiza en un tampón que comprende una mezcla de tampón de fosfato de sodio y propilenglicol a pH 7.

En otra realización el porcentaje de propilenglicol en la mezcla del tampón de elución está entre 5 %-70 %.

- 45 En otra realización, el porcentaje de propilenglicol está entre 30 %-50 %.

En una realización preferida, el tampón de elución comprende una mezcla de fosfato de sodio 50 mM y propilenglicol al 35 % a pH 7.

En otra realización, el tampón de elución comprende PBS.

En otra realización, el tampón de elución de PBS comprende adicionalmente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de etilenglicol.

En otra realización, el tampón de elución de PBS comprende adicionalmente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de propilenglicol.

5 En otra realización, el tampón de elución de PBS comprende adicionalmente cloruro de sodio 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M o 2,0 M.

En otra realización, el tampón de elución comprende adicionalmente cloruro de sodio y etilenglicol o propilenglicol.

En una realización, se puede centrifugar o filtrar el fluido celular antes de cargar el fluido celular en la columna.

10 En otra realización preferida el fluido que comprende IL-18BP se filtra a través de un filtro de 0,45 µm antes de cargar el fluido en la columna de afinidad.

En otra realización, el procedimiento de la invención comprende además una o más etapas de cromatografía adicionales seleccionadas del grupo que consiste en cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa y cromatografía de intercambio aniónico.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende además

- 15 a. cromatografía de interacción hidrófoba,  
b. cromatografía de fase inversa, y  
c. cromatografía de intercambio aniónico.

Si la proteína purificada según el procedimiento de la invención se destina a administración a los seres humanos, es ventajoso incluir también en el procedimiento una o más etapas de separación de virus. Preferiblemente, se realiza una etapa de filtración para separación de virus después de la cromatografía de afinidad.

20 Si el volumen inicial del fluido a partir del cual se purifica la IL-18BP es grande, puede ser ventajoso reducir el volumen de material capturando la proteína y volviéndola a suspender en un volumen más pequeño de tampón antes de empezar realmente el procedimiento de purificación.

25 Con el fin de facilitar el almacenaje o el transporte, por ejemplo, se puede congelar el material y descongelar antes y/o después de cualquier etapa de purificación de la invención.

De acuerdo con la presente invención, la IL-18BP a purificar puede ser nativa, esto es IL-18BP que está presente en la naturaleza. Puede ser purificada por tanto a partir de cualquier fuente o material natural, tal como por ejemplo a partir de fluidos corporales tales como la orina.

30 La IL-18BP se puede derivar también de cualquier fuente animal o humana. Preferiblemente, la IL-18BP a purificar es humana, y más preferiblemente es IL-18BP recombinante. La IL-18BP recombinante se puede producir en sistemas de expresión procarióticos, tales como en sistemas bacterianos como *Escherichia coli*. Se puede producir también en sistemas de expresión eucarióticos, tales como levaduras, insectos, o células de mamífero. De acuerdo con la presente invención, se prefiere expresar la IL-18BP en células de mamífero tales como líneas celulares animales, o en líneas celulares humanas. Las células de ovario de hámster chino (CHO) son un ejemplo de una línea celular que es particularmente adecuada para la expresión de IL-18BP.

35 Si la IL-18BP a purificar se expresa en células de mamífero que la segregan, el material de partida del procedimiento de purificación de la invención es el sobrenadante del cultivo celular, también llamado IL-18BP de cosecha o cruda. Si las células se cultivan en un medio que contiene suero animal, el sobrenadante del cultivo celular contiene también proteínas del suero como impurezas.

40 Preferiblemente, las células que expresan IL-18BP se cultivan en condiciones libres de suero. En este caso, el material de partida del procedimiento de purificación de la invención es el sobrenadante del cultivo celular exento de suero que contiene principalmente proteínas de la célula hospedante como impurezas. Si se añaden factores de crecimiento al medio de cultivo celular, tales como insulina, por ejemplo, estas proteínas serán asimismo eliminadas preferiblemente durante el procedimiento de purificación.

45 Puesto que la IL-18BP es una proteína soluble, segregada, se libera en el sobrenadante del cultivo celular, por medio de su péptido señal natural, o por medio de un péptido señal heterólogo, esto es un péptido señal derivado de otra proteína segregada que puede ser más eficiente en el sistema particular de expresión utilizado. El fluido a partir del cual se purifica la IL-18BP es por tanto preferiblemente el sobrenadante del cultivo celular, tal como por ejemplo el sobrenadante de células CHO. El sobrenadante del cultivo celular puede comprender suero derivado de animales, si las células se cultivan en medio que contiene suero. Se prefiere purificar la proteína a partir del sobrenadante de células que hayan sido cultivadas en medio exento de suero, esto es en medio de cultivo que no contiene suero derivado de ternera fetal ni de otras fuentes animales.

- El término "proteína de unión a IL-18" se utiliza en esta memoria como sinónimo de "IL-18BP". Este término se refiere a las proteínas de unión a IL-18 tales como las definidas en el documento WO 99/09063 o en Novick *et al.*, 1999. El término IL-18BP incluye las variantes de corte y empalme y/o las isoformas de proteínas de unión a IL-18, como las definidas en Kim *et al.*, 2000, en particular las isoformas humanas a y c de IL-18BP. El término "IL-18PB", como se utiliza en esta memoria, incluye además muteínas, derivados funcionales, fracciones activas, proteínas fusionadas, proteínas permutadas circularmente y tiras de IL-18BP como se definen en el documento WO 99/09063.
- La IL-18BP sujeta al procedimiento de purificación según la presente invención puede ser glicosilada o no glicosilada, se puede derivar de fuentes naturales, tales como la orina, o se puede producir preferiblemente de forma recombinante. La expresión recombinante se puede llevar a cabo en sistemas de expresión procarióticos como *E. coli*, o en sistemas de expresión eucarióticos, y preferiblemente en mamíferos.
- Como se utiliza en esta memoria, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-18BP, o análogos de una IL-18BP viral, en los que uno o más de los restos aminoácidos de una IL-18BP natural o IL-18BP viral están reemplazados por diferentes restos aminoácidos, o han sido delecionados, o se añaden uno o más restos aminoácidos a la secuencia natural de una IL-18BP, o de una IL-18BP viral, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo natural o la IL-18BP viral. Estas muteínas se preparan por síntesis y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio conocidas, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.
- Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen las proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, que se hibrida con DNA o RNA, que codifica una IL-18BP o que codifica una IL-18BP viral (descritas ambas en el documento WO99/09063) en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación y subsiguiente lavado, a las que los expertos en la técnica se refieren convencionalmente como "rigurosas". Véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la temperatura calculada de fusión (Tm) del híbrido en estudio, por ejemplo, 2 × SSC (citrato sódico salino) y SDS (dodecilulfato de sodio) al 0,5 % durante 5 minutos, 2 × SSC y SDS al 0,1 % durante 15 minutos; 0,1 × SSC y SDS al 0,5 % a 37 °C durante 30-60 minutos y después, 0,1 × SSC y SDS al 0,5 % a 68 °C durante 30-60 minutos. Las personas con experiencia normal en la técnica entienden que las condiciones de rigurosidad dependen también de la longitud de las secuencias de DNA, de las sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametil-amonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.
- La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las dos secuencias de polinucleótidos o de las dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, por toda la longitud de las secuencias a comparar.
- Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar el "% de identidad". En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineamiento. Se puede determinar el % de identidad por toda la longitud de cada una de las secuencias a comparar (denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma longitud o muy similar, o sobre longitudes más cortas, definidas (denominado alineamiento local), que es más adecuado para las secuencias de longitud desigual.
- Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así por ejemplo, los programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J *et al.*, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, se pueden usar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. El programa BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (1981) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias son conocidos también en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F *et al.*, 1990, Altschul S F *et al.*, 1997, accesible a través de la página principal de NCBI en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y FASTA (Pearson W R, 1990).
- Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP, o suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP viral, como para tener una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. La actividad de la IL-18BP es su capacidad de unirse a IL-18. Siempre que la muteína tenga una actividad sustancial de unión a la IL-18, se puede utilizar en la purificación de IL-18, tal como por medio de la cromatografía de afinidad, y por tanto se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Por lo tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que la IL-18BP por medio de experimentación rutinaria que comprende someter dicha muteína, por ejemplo, a un simple ensayo de competición en sandwich para determinar si se une o no a una IL-18 marcada apropiadamente, tal como el radioinmunoensayo o el ensayo ELISA.

En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos el 40 % de identidad u homología con la secuencia de IL-18BP o de un homólogo de una IL-18BP codificada viralmente, como se define en el documento WO 99/09063. Más preferiblemente, tiene al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o, lo más preferiblemente, al menos el 90 % de identidad u homología con la misma.

- 5 Las muteínas de los polipéptidos IL-18BP o las muteínas de las IL-18BP virales, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que se pueden obtener rutinariamente por una persona de experiencia normal en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y guías presentadas en esta memoria.
- 10 Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son lo que se conoce como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos o proteínas IL-18BP o las IL-18BP virales, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tienen propiedades físicoquímicas suficientemente similares de forma que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es claro que las inserciones y delecciones de aminoácidos se pueden hacer también en las secuencias definidas antes sin alterar su función, particularmente si las inserciones o delecciones implican solamente a unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no separan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales delecciones y/o inserciones están dentro del ámbito de la presente invención.
- 15
- 20 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 1. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 2; y lo más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 3.

TABLA I

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

25

TABLA II

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr

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

TABLA III

Grupos aún más preferidos de aminoácidos sinónimos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

- 5 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden usar para obtener mutéinas de polipéptidos o proteínas IL-18BP, o mutéinas de las IL-18BP virales, para uso en la presente invención incluyen etapas de cualquier método conocido, tal como se presentan en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, para Mark *et al.*; 5.116.943 para Koths *et al.*, 4.965.195 para Namen *et al.*; 4.879.111 para Chong *et al.*; y 5.017.691 para Lee *et al.*; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de Estados Unidos No. 4.904.584 (Shaw *et al.*)
- 10 El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP, o una IL-18BP viral, o una mutéina o fragmento de la misma, fusionada con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en los fluidos corporales. Una IL-18BP o una IL-18BP viral, se pueden fusionar por tanto con otra proteína, polipéptido o similares, por ejemplo, un inmunoglobulina o un fragmento de la misma.
- 15 "Derivados funcionales" como se usa aquí cubre los derivados de las IL-18BP o de una IL-18BP viral, y sus mutéinas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención siempre que permanezcan farmacéuticamente aceptables, esto es que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-18BP, o las IL-18BP virales, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.
- 20 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar los sitios antígenicos y prolongar el tiempo de residencia de una IL-18BP o una IL-18BP viral en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amonio o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los restos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo grupos alcanoilo o aroilo carbocíclico) o derivados O-acilo de los grupos hidroxilo libres (por ejemplo el de los restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.
- 25 Como "fracciones activas" de una IL-18BP, o una IL-18BP viral, las mutéinas y las proteínas fusionadas, la presente invención cubre cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptido de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o restos ligados a las mismas, por ejemplo, restos de azúcar o fosfato, o agregados

de la molécula de proteína o los restos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga sustancialmente una actividad similar a la de la IL-18BP.

El término "sales" se refiere en esta memoria tanto a las sales de los grupos carboxilo como a las sales de adición de ácido de los grupos amino de la molécula inhibidora de IL-18, o análogos de la misma. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, sales férricas o sales de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tal como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Naturalmente, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica del inhibidor de IL-18, tal como la inducción de IFN-gamma en las células sanguíneas.

Las secuencias de IL-18BP y sus variantes de corte y empalme/isoformas se pueden tomar del documento WO99/09063 o de Novick *et al.*, 1999, así como de Kim *et al.*, 2000.

Los derivados funcionales de IL-18BP se pueden conjugar a polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semi vida, biodisponibilidad, tolerancia por parte del cuerpo humano, o inmunogenicidad. Para conseguir este objetivo, la IL18-BP se puede unir por ejemplo a polietilenglicol (PEG). Se puede llevar a cabo la PEGilación por métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo. Por lo tanto, en una realización preferida, el derivado funcional comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que aparecen como una o más cadenas laterales sobre los restos de aminoácidos. Es muy preferida una realización en la que el resto es polietilenglicol (PEG).

En otra realización preferida de la invención, la IL-18BP comprende una fusión con inmunoglobulina, esto es el inhibidor de IL-18 es una proteína de fusión que comprende toda o parte de una proteína de unión a IL-18, que se fusiona con toda o con una porción de una inmunoglobulina. Los métodos para preparar las proteínas de fusión a inmunoglobulina son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. Los expertos en la técnica entenderán que la proteína de fusión resultante de la invención retiene la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa, o mediante un péptido enlazador corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 restos aminoácidos de longitud o más largos, por ejemplo, 13 restos aminoácidos de longitud. Dicho enlazador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia de enlace de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene mejores propiedades, tales como un tiempo de residencia (semi vida) más prolongado en los fluidos corporales, aumento de la actividad específica, aumento del nivel de expresión, o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En una realización preferida, la IL-18BP se fusiona a la región constante de una molécula Ig. Preferiblemente, se fusiona a las regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, por ejemplo. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina está descrita en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como las isoformas IgG<sub>2</sub> o IgG<sub>4</sub>, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero- u homomultiméricas. En un tercer aspecto, la invención se refiere a una proteína purificada por el procedimiento de purificación según la invención. En el texto que sigue, tal proteína se denomina también "IL-18BP purificada". Tal IL-18BP purificada es preferiblemente IL-18BP altamente purificada. La IL-18BP altamente purificada se determina por ejemplo por la presencia de una única banda en el gel PAGE teñido por plata después de la carga de proteína en la cantidad de 2 mcg por pista. La IL-18BP purificada se puede definir también como un único pico móvil en HPLC.

La preparación de IL-18BP obtenida del procedimiento de purificación de la invención puede contener menos del 20 % de impurezas, preferiblemente menos del 10 %, 5 %, 3 %, 2 % o 1 % de impurezas, o se puede purificar hasta la homogeneidad, es decir hasta que esté libre de cualquier contaminante proteico.

La IL-18BP purificada se puede destinar a uso terapéutico, esto es para la administración a pacientes. Si la IL-18BP purificada se administra a pacientes, se administra preferiblemente sistémicamente, y preferiblemente subcutáneamente o intramuscularmente, o tópicamente, esto es, localmente. La administración rectal o intratecal también puede ser adecuada, dependiendo del uso específico de la IL-18BP purificada.

Para este fin, la IL-18BP purificada se puede formular como una composición farmacéutica, esto es junto con un vehículo, excipientes o similares farmacéuticamente aceptables.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" significa que engloba cualquier vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedante al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la proteína o proteínas activas se pueden formular en una forma farmacéutica unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, solución de seroalbúmina y solución de Ringer.

- Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar a un individuo de muchos modos. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal, e intranasal. Se puede usar cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o por terapia génica en la que se administra al paciente (por ejemplo mediante un vector) una molécula de DNA que codifica el agente activo, lo que hace que el agente activo sea expresado y segregado *in vivo*. Además, la proteína o proteínas según la invención se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos, farmacéuticamente aceptables.
- 5        10        15        20        25        30
- Para la administración parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular), la proteína o proteínas activas se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la tonicidad (por ejemplo manitol) o la estabilidad química (por ejemplo conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por técnicas usadas habitualmente.
- La biodisponibilidad de la proteína o proteínas activas según la invención se puede mejorar también utilizando procedimientos de conjugación que aumentan la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo uniendo la molécula a polietilenglicol, como se describe en la solicitud de patente PCT WO 92/13095.
- Las cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína o proteínas activas serán una función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por IL-18, cualquier actividad citotóxica residual presentada por los antagonistas, la vía de administración, la condición clínica del paciente (incluyendo la conveniencia de mantener un nivel no tóxico de actividad de IL-18 endógena).
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que cuando se administra, el inhibidor de IL-18 produce una inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosis administrada a un individuo, como dosis única o múltiple, variará dependiendo de una serie de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, talla), la gravedad de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosis establecidos está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.
- La IL-18BP purificada se puede usar en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg o aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.
- En otras realizaciones preferidas, la IL-18BP purificada se administra diariamente o en días alternos o tres veces por semana o una vez por semana.
- concentraciones y condiciones sin separarse del espíritu y alcance de la invención y sin experimentación excesiva.
- Aunque esta invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de la misma, se debe entender que se pueden hacer otras modificaciones. Se entiende que esta solicitud cubre todas las variaciones, usos o adaptaciones de la invención que sigan, en general, los principios de la invención incluyendo las desviaciones de la presente descripción que surgen de la práctica conocida y habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y que se pueden aplicar a las características esenciales mencionadas anteriormente y expuestas a continuación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ningún modo un reconocimiento de que algún aspecto, descripción o realización de la presente invención esté descrito, enseñado o sugerido en la técnica relevante.
- La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará por tanto completamente la naturaleza general de la invención que, aplicando el conocimiento dentro de la experiencia en la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas aquí), otros pueden modificar fácilmente y/o adaptar tales realizaciones específicas para diferentes aplicaciones, sin experimentación excesiva, sin separarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones se pretende que estén dentro de lo que significa un intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, basado en las enseñanzas y guías presentadas aquí. Se debe entender que la fraseología o terminología de esta memoria tiene el propósito de descripción y no de limitación, de forma que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por los expertos a la luz de las enseñanzas y guías presentadas aquí, en combinación con los conocimientos de una persona con experiencia normal en la técnica.

**Ejemplo 1: Purificación de la IL-18BP humana, recombinante, procedente del sobrenadante de células CHO exentas de suero**

Para la purificación se utilizaron columnas de afinidad que comprenden ligandos de afinidad inmovilizados, según las fórmulas (I) o (II).

El ligando de afinidad se unió a una matriz como se indica en el esquema de síntesis 1. La columna se llenó con el material de columna de afinidad sintetizado siguiendo las instrucciones generales para el material comercial de cromatografía de afinidad e inmediatamente se determinó un blanco antes de su uso.

5 Se equilibraron las columnas del Pики Kit llenadas por gravedad de 1 ml fritado, con 15 CV (volúmenes de columna) de PBS a pH 7,0.

El procedimiento de purificación empieza con la IL-18BP humana recombinante presente en el sobrenadante de cultivo celular libre de suero procedente de células CHO que expresan IL-18BP, sin filtrar, descongelado a 25 °C.

10 Se cargó la columna con aproximadamente 1-2 mg de la r-hIL-18BP cosechada. Se filtró la solución por un filtro de 0,45 µm antes de cargar la columna.

Después de completar la carga de la muestra, se lavó la columna con aproximadamente 10 volúmenes de columna de PBS, pH 7,0 (lavado 1) y con aproximadamente 10 volúmenes de columna de PBS/NaCl 0,2, pH 7,0 (lavado 2). Se desecharon estas fracciones (FT) porque sólo contenían impurezas del cultivo celular.

15 Se comenzó la elución con 5 volúmenes de columna de PBS/NaCl 0,5/etilenglicol al 50 %. La r-hIL-18BP se eluyó como un pico principal. En la figura 1 se muestra un perfil de elución típico

Después de completar la elución, se lavó y sanitizó la columna con una corriente de 5 volúmenes de columna de tampón de regeneración que contenía alcohol isopropílico al 30 % y NaOH 0,2 M.

Condiciones generales de la cromatografía de afinidad:

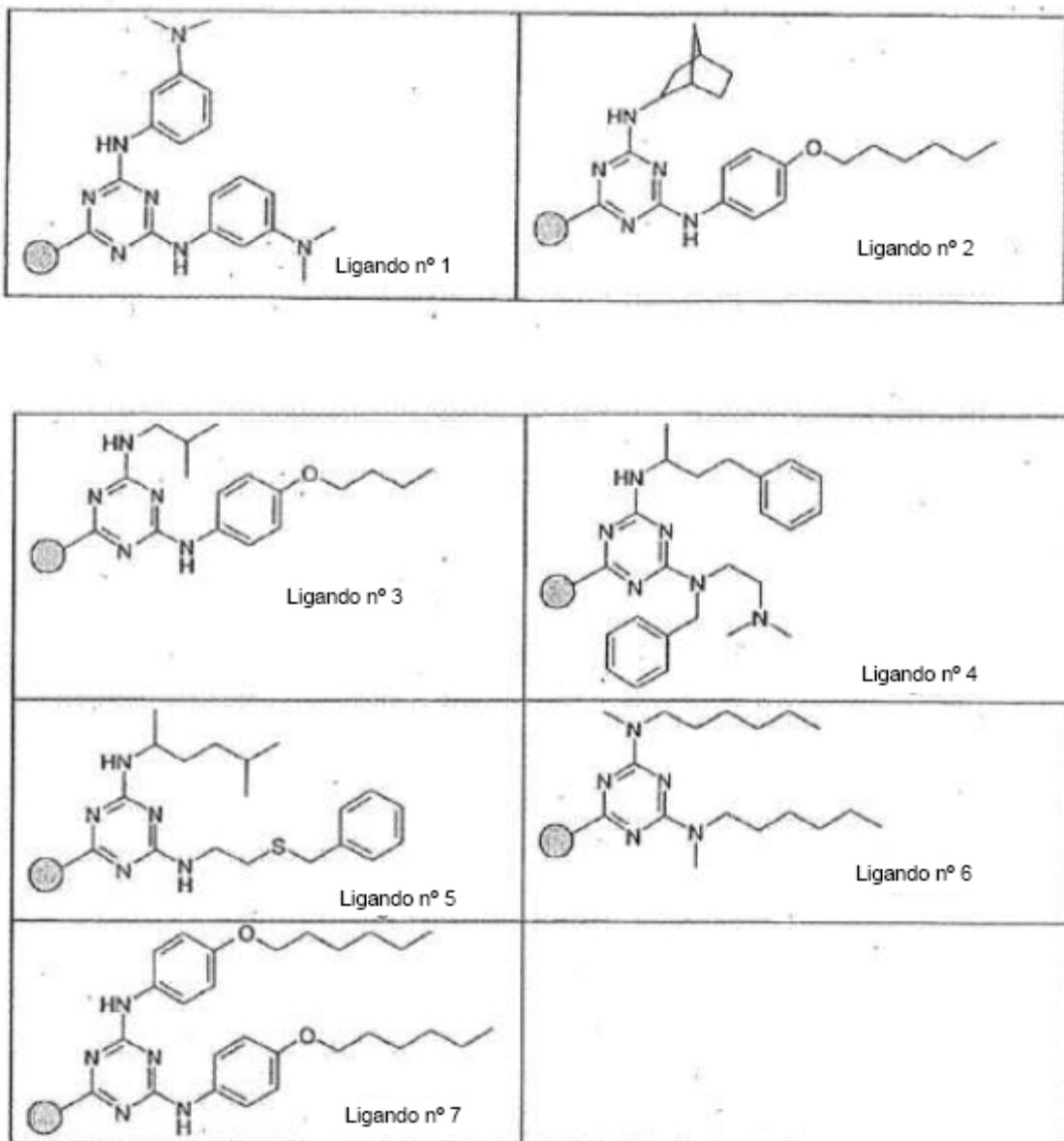
20 Temperatura: 16-25 °C (temperatura ambiente) o 4 °C.

Ligando	Ligandos nº 1-7
Altura del lecho	1 ml fritado, alimentado por gravedad
Equilibrio	15 volúmenes de columna de PBS, pH 7,0
Carga	Cosecha clarificada filtrada por 0,45 µm
Lavado 1	10 volúmenes de columna de PBS, pH 7,0
Lavado 2	10 volúmenes de columna de PBS/NaOH 0,2, pH 7
Elución	PBS/NaCl 0,5 l/etilenglicol al 50 %
Regeneración y sanitización	alcohol isopropílico al 30 %/NaOH 0,2 M.

Análisis de la proteína purificada

1. Elisa (de la carga, flujo y eluato)
2. SDS-PAGE/CB (del flujo y eluato)
3. SDS-PAGE/WB (del flujo y eluato)
4. Análisis de Bradford (de la carga, flujo y eluato)

25 El análisis de las fracciones de flujo y eluato reveló bandas de proteína pura a 55-66 kDa en el eluato sobre geles SDS-PAGE. Se obtuvo proteína IL18BP de alta pureza con ligandos de afinidad de las siguientes estructuras:



La figura 2 resume las recuperaciones y purezas de las fracciones de las cromatografías con los ligandos de afinidad nº 2, nº 5, nº 6 y nº 7. El contenido de proteína se determinó por HPLC.

Las transferencias Western indicaron que los eluatos reunidos y las fracciones de cola de la elución presentaron una pureza de más del 80 % utilizando los ligandos de afinidad nº 2, nº 6, y nº 7. Los ligandos nº 6 y nº 7 presentaron una selectividad preferida para la elución del monómero IL-18BP sobre el dímero y formas agregadas (no se muestran los resultados).

La figura 3 resume en una tabla la influencia de diferentes lavados y tampones de elución sobre los rendimientos de la proteína IL-18BP total recuperada, su forma monomérica y su forma dimérica. Se llevó a cabo la purificación con el ligando de afinidad nº 6.

**Ejemplo 2: Purificación de la IL-18BP humana, recombinante, procedente del sobrenadante de células CHO exentas de suero**

Para la purificación se utilizaron columnas de afinidad que comprenden ligandos de afinidad inmovilizados, según las fórmulas (I) o (II).

El ligando de afinidad se unió a una matriz como se indica en el esquema de síntesis 1. La columna se llenó con el material de columna de afinidad sintetizado siguiendo las instrucciones generales para el material comercial de cromatografía de afinidad e inmediatamente se determinó un blanco antes de su uso.

Se equilibró la columna con 5 BV (volúmenes de columna) de tampón de fosfato de sodio 50 mM+Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 M, pH 5,5, conductividad 103 mS/cm.

El procedimiento de purificación empieza con la IL-18BP humana recombinante presente en el sobrenadante de cultivo celular libre de suero procedente de células CHO que expresan IL-18BP, sin filtrar, descongelado a 25 °C.

- 5 Se cargó la columna con aproximadamente 1,55 mg de r-hIL-18BP cosechada + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 M, por lo que se ajustó el pH a 5,5 con ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).. Se filtró la solución por un filtro de 0,45 µm antes de cargar la columna.

Después de completar la carga de la muestra, se lavó la columna con aproximadamente 10 volúmenes de columna de tampón de fosfato de sodio 50 mM + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 M, pH 5,5, conductividad 103 mS/cm. Se desecharon estas fracciones (FT) porque sólo contenían impurezas del cultivo celular.

- 10 Se lavó la columna con un tampón que contiene una mezcla de fosfato de sodio y sulfato de sodio.

Se empezó la elución con tampón de fosfato de sodio 50 mM + propilenglicol al 35 %, pH 7, conductividad 70 mS/cm. La r-hIL-18BP se eluyó como un pico principal. En la figura 1 se muestra un perfil de elución típico

Después de completar la elución, se lavó y sanitizó la columna con una corriente de 3 volúmenes de columna de tampón de regeneración que contenía 1,6-hexanodiol al 50 %/NaOH 1 M.

- 15 Se mantuvo la columna en hidróxido de sodio 10 mM a temperatura ambiente hasta su uso en el siguiente ciclo.

Condiciones generales de la cromatografía de afinidad:

Temperatura: 16-25 °C (temperatura ambiente).

Ligando	Ligando nº 6
Capacidad de carga de IL-18BP	14 g/l
Altura del lecho	al menos 12 cm
Equilibrio	230 cm/h; 5 volúmenes de columna; fosfato de sodio 50 mM + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,2 M/pH 5,5/conductividad 103 mS/cm
Carga	53 cm/h, cosecha + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,2 M, filtrada por 0,45 µm y pH ajustado a 5,5 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Lavado	53 cm/h; 10 volúmenes de columna o < 100 mAU de fosfato de sodio 50 mM + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6 M/pH 5,5/conductividad 70 mS/cm
Elución	230 cm/h; 7 volúmenes de columna; fosfato de sodio 50 mM + propilenglicol al 35 %/pH 7
Regeneración y sanitización	-230 cm/h; 1,6-hexanodiol al 50 %/NaOH 1 M, flujo inverso; 3 volúmenes de columna - 4 horas de contacto -230 cm/h; agua para inyectables; 3 volúmenes de columna
Almacenamiento	230 cm/h; NaOH 10 M; 3 volúmenes de columna

- 20 La media de las dos purificaciones dio IL-18BP, con una pureza del 87 % según Bradford (HCP 30000 ppm). La recuperación del monómero fue el 97 % del material de partida.

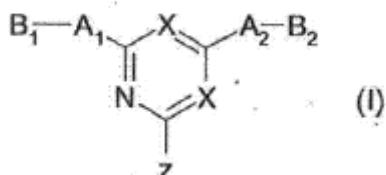
**Referencias**

1. Altschul S F *et al*, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990
2. Altschul S F *et al*, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997
3. Devereux J *et al*, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984
4. Grantham *et al*, Science, Vol. 185, pp. 862-864, 1974
5. Kim S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97, 1190-1195.
6. Novick, D. *et al.*, Immunity 10, 127-136, 1999.
7. Pearson, Methods Enzymol, 183, 63-98, 1990.
8. Puren *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 96(5), 2256-61, 1999.
9. Urushihara, J Pediatr Surg. 35, 446-, 2000.
10. Vigers *et al.*, Nature. 386 (6621)190-4, 1997.
11. WO 99/09063
12. WO 01/07480
13. WO 01/62285
14. WO 01/85201
15. WO 02/060479
16. WO 02/096456
17. WO 03/080104
18. WO 02/092008

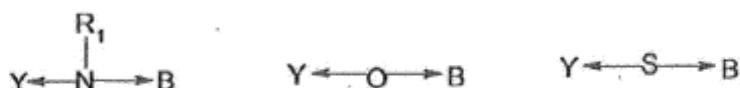
- 19. WO 02/101049
- 20. WO 03/013577
- 21. WO 92/13095
- 22. WO 01/03737
- 5        23. U.S. Pat. No. 4.959.314
- 24. U.S. Pat. No. 4.588.585
- 25. U.S. Pat. No. 4.737.462
- 26. U.S. Pat. No. 5.116.943
- 27. U.S. Pat. No. 4.965.195
- 10      28. U.S. Pat. No. 4.879.111
- 29. U.S. Pat. No. 5.017.691
- 30. U.S. Pat. No. 4.904.584

## REIVINDICACIONES

1. El uso de un ligando de afinidad según la fórmula (I)



en la que A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se seleccionan del grupo que consiste en una amina, éter y tioéter de las estructuras:

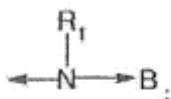


5

en las que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo; B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y arilo, donde dichos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> pueden estar sustituidos con R<sub>2</sub>, OR<sub>2</sub>, SR<sub>2</sub>, o N(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; cada R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo; cada X representa independientemente un nitrógeno, un carbono que lleva un hidrógeno, un carbono que lleva un grupo cloro o un carbono que lleva un grupo ciano; y Z es un grupo funcional capaz de reacción con una matriz seleccionada de amina, azida e hidroxilo o es una amina de agarosa activada por amina que reacciona directamente con el ligando; para la producción de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) purificada.

10

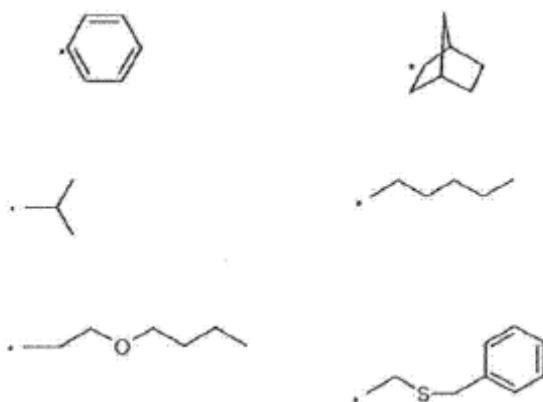
15 2. El uso según la reivindicación 1, en el que A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> son una amina de la estructura

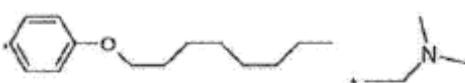
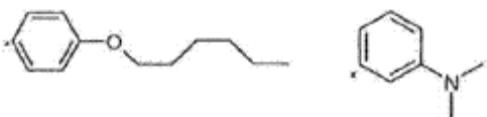


20

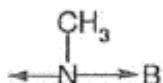
B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o arilo; donde dichos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> pueden estar sustituidos con R<sub>2</sub>, OR<sub>2</sub>, SR<sub>2</sub>, o N(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo; y cada R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo.

3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> pueden estar sustituidos con R<sub>2</sub>, OR<sub>2</sub>, SR<sub>2</sub>, o N(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub> y dichos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> o dichos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> sustituidos se seleccionan independientemente del grupo de





4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son hexilo.  
 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> son una amina de la estructura



- 5  
 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada X es nitrógeno.  
 7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que Z es -NH-.  
 8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la matriz es agarosa.  
 9. El uso de un ligando de afinidad como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la captura de IL-18BP a partir de un fluido.  
 10. Un procedimiento para la producción de IL-18BP purificada, que comprende someter un fluido a cromatografía de afinidad, utilizando un ligando de afinidad como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.  
 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que la cromatografía de afinidad se realiza a temperatura ambiente.  
 15 12. El procedimiento según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la recuperación de IL-18BP es más de aproximadamente el 40 % o más de aproximadamente el 50 % después de la cromatografía de afinidad.  
 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la pureza de la IL-18BP es aproximadamente > del 60 % o aproximadamente > del 70 % o aproximadamente > del 80 % después de la cromatografía de afinidad.  
 20 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el porcentaje de IL-18BP monomérica es más alto del 80 % después de la cromatografía de afinidad.

15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende además una cromatografía seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa y cromatografía de intercambio iónico.
- 5 16. El procedimiento según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende además una o más etapas de filtración para separación de virus.
17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que la IL-18BP es una IL-18BP humana recombinante.
18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que el fluido es el sobrenadante de cultivo celular exento de suero.

ES 2 375 831 T3

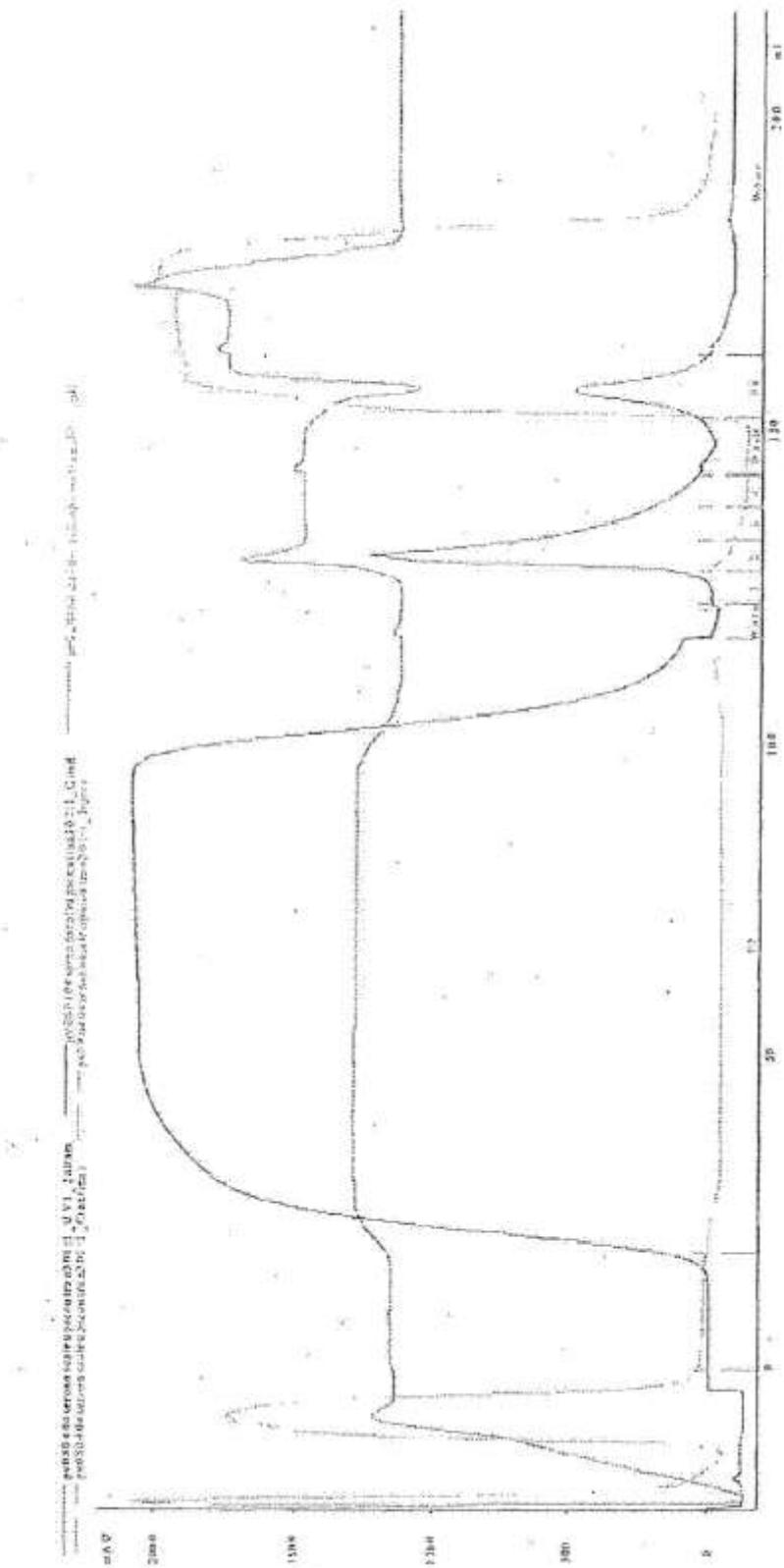


Figura 1

# ES 2 375 831 T3

Adsorbente	Fracción	Prot. total [µg/ml]	Vol. [ml]	Prot. total [µg]	IL18BP [µg/ml]	IL18BP total [µg]	% pureza	% recuperación	% agregados	% dímeros	% monómeros
										%	%
<b>Ligando nº 2</b>											
NB	Carga	602	80	48160	216,4	17312	36	100	6,92	22,39	70,67
	E	124	118	14632	37,7	4448,6	30	26	0	6,74	93,26
	ET	727	10	7270	834,6	8346	115	48	0,25	13,53	86,22
Ligando nº 5	Carga	257	5	1285	272	1360	106	8	0,66	17,02	82,32
	NB	646	80	51680	229,1	18328	35	100	7,64	22,37	69,99
	E	91	100	9100	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0	3,55	96,45
Ligando nº 6	ET	1279	10	12790	1153,1	11531	90	63	2,6	17,91	78,49
	Carga	349	5	1745	376	1880	108	10	3,26	21,81	74,93
	NB	577	80	46160	227,1	18168	39	100	5,6	23,3	71,1
Ligando nº 7	E	48	116	5568	n. d.	n.d.	n. d.	n. d.	0	3,85	96,15
	ET	887	10	8870	1026,1	10261	116	56	0	10,91	89,09
	Carga	365	5	1825	428,7	2143,5	117	12	0	8,96	91,04
Ligando nº 7	NB	701	80	56080	221,3	17704	32	100	4,4	23,91	71,65
	E	54	110	5940	9,9	1089	18	8	0	4,82	95,18
	ET	867	10	8670	803	8030	93	45	0	10,84	89,16
		247	5	1235	346,8	1734	140	10	0	12,69	87,31

Figura 2

Experimento	Condiciones de lavado (recuperación/monómero/dímero %/%/%)	Condiciones de elución (todos a pH 7,0 a menos que se indique) (recuperación/monómero/dímero %/%/%)	NB (%)	Recuperación global (%)
1	Ninguna	PBS/EG 50% /NaCl 500 mM (75/88/12)	1,7	76,7
2	PBS, pH 7,0 (10/84/16)	PBS/EG 10% (3,7/96/4) PBS/EG 20% (5,4/90/10) PBS/EG 30% (9,6/92/8) PBS/EG 40% (7,9/80/20) PBS/EG 50% /NaCl 500 mM (2,4/n.d./n.d.)	0	51,8
3	PBS, pH 7,0 (10/84/16)	PBS/NaCl 0,5 M (0,2/n.d./n.d.) PBS/NaCl 1,0 M (0/n.d./n.d.) PBS/NaCl 1,5 N (0/n.d./n.d.) PBS/NaCl 2,0 M (0/n.d./n.d.) PBS/EG 50% /NaCl 500 mM (48,7/9/1/9)	0	56,9
4	PBS, pH 7,0 (14,8/n.d./n.d.)	PBS/tiocianato de amonio 2 M (35,6/n.d./n.d.) PBS/EG 50% /NaCl 500 mM (8,4/n.d./n.d.)	3,1	58,8
5	Ninguna	PBS/PEG 1% pH 7,0 (15,1/n.d./n.d.) PBS/PEG 1% pH 8,5 (2,9/n.d./n.d.) PBS/EG 50% /NaCl 500 mM (42,3/n.d./n.d.)	0	60,3

Figura 3