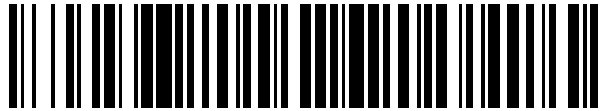


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 482**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.1999 E 10011212 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2374872**

54 Título: **Un método para la expresión a alto nivel de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y su purificación**

30 Prioridad:

17.12.1998 US 112752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2015

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (100.0%)
250 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BROWNING, JEFFREY;
MIATKOWSKI, KONRAD y
MEIER, WERNER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 554 482 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

Un método para la expresión a alto nivel de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y su purificación

Antecedentes

5 La familia de TNF consiste en pares de ligandos y sus receptores específicos denominados como ligandos de la familia de TNF y receptores de la familia de TNF (Bazzoni y Beutler, 1996; Aggarwal y Natarajan, 1996). Los ligandos tales como TNF se encuentran típicamente como formas unidas a la membrana en las superficies celulares, o en algunos casos se escinden de forma selectiva de la superficie celular y se secretan. Los ligandos se unen a receptores específicos y el suceso de unión sirve para agregar dos o más receptores. Los dominios intracelulares de estos receptores pueden de alguna forma sentir este cambio y comunicar esta información en la célula por medio de un mecanismo de transducción de señal. La familia está implicada en la regulación del sistema inmune y posiblemente otros sistemas no inmunológicos. La regulación está a menudo a un nivel de "interruptor maestro" de manera que la señalización de la familia de TNF puede dar por resultado un gran número de sucesos posteriores mejor tipificados por TNF. El TNF puede iniciar la respuesta inflamatoria protectora general de un organismo a la invasión exterior que implica la presentación alterada de moléculas de adhesión implicadas en el tráfico celular, producción de quimioquina para llevar células específicas en compartimentos específicos y el cebado de varias células efectoras. Como tal, la regulación de estas rutas tiene potencial clínico.

La familia del receptor de TNF es una colección de proteínas relacionadas que consisten generalmente en un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular se construye a partir de 2-6 copias de un dominio fuertemente unido por disulfuro y se reconoce en base a la disposición única de residuos de cisteína (Banner et al, 1993). Cada receptor se une a un(os) ligando(s) correspondiente(s) aunque un ligando puede compartir varios receptores. En algunos casos, está claro que las formas solubles de los receptores que carecen de la región transmembrana y/o dominio intracelular existen de forma natural. En la naturaleza, las versiones truncadas de estos receptores pueden tener papeles reguladores biológicos directos. Un ejemplo de este proceso se proporciona por el sistema de osteoprotegerina. La osteoprotegerina es un receptor de la familia de TNF secretado que bloquea la señal por medio del RANK-L (también denominado TRANCE) y/o TRAIL a receptores que desencadenan la activación de osteoclastos. Bloqueando estos receptores, lo más probable el receptor RANK, la resorción ósea está impedida y la masa ósea aumenta (Bucay et al, 1998). Claramente, los virus han usado esta táctica para inhibir la actividad de TNF en sus organismos huésped (Smith et al, 1994). Estos receptores pueden señalar un número de sucesos que incluyen señales de diferenciación celular, muerte celular o supervivencia celular. La señalización de muerte celular a menudo se desencadena por medio de uniones relativamente directas a la cascada de proteasas caspasa en el caso de los receptores de Fas y TNF.

Los receptores de TNF son herramientas poderosas para elucidar las rutas biológicas ya que se convierten fácilmente a proteínas de fusión de inmunoglobulina que tienen largas vidas medias en suero. Las formas del receptor solubles diméricas pueden ser inhibidores de sucesos mediados por ligandos o bien secretados naturales o unidos a la superficie. Mediante la unión de estos ligandos estas proteínas de fusión evitan que el ligando interactúe con receptores asociados a la célula e inhiba la señal asociada. Estas proteínas de fusión del receptor Ig son útiles en un sentido experimental, y también se han usado con éxito clínicamente, por ejemplo TNF-R-Ig se ha usado para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide y el síndrome clínico agudo que acompaña a la administración de OKT3 (Eason et al., 1996; Feldmann et al., 1997; van Dulleman et al., 1995). La manipulación de los muchos sucesos mediados por señalización a través de la familia de receptores de TNF puede tener aplicación en el tratamiento de enfermedades con base inmune además de un amplio intervalo de enfermedades humanas que tienen secuelas patológicas debido a la implicación del sistema inmune. Por ejemplo, una forma soluble de un receptor descrito recientemente, osteoprotegerina, se ha mostrado que bloquea la pérdida de masa ósea (Simmonet et al, 1997). Así, los sucesos controlados por la señalización del receptor de la familia de TNF no están limitados necesariamente a la regulación del sistema inmune. Los anticuerpos a los receptores pueden bloquear la unión del ligando y así también tiene aplicación clínica. Dichos anticuerpos están vivos a menudo mucho tiempo y pueden tener ventajas sobre las proteínas de fusión del receptor Ig solubles que tienen vidas medias más cortas en sangre.

Mientras la inhibición de la ruta mediada por el receptor representa la aplicación terapéutica más explotada de estos receptores, originalmente fue la activación de los receptores de TNF lo que mostró promesas clínicas (Aggarwal y Natarajan, 1996). La activación de los receptores de TNF pueden iniciar la muerte celular en la célula diana y por tanto la aplicación a tumores fue y aún es atractiva (Eggermont et al., 1996). El receptor puede activarse o bien por administración del ligando, es decir, la ruta natural o por administración de anticuerpos que pueden reticular el receptor. Los anticuerpos pueden ser ventajosos para el tratamiento de, por ejemplo, cánceres, ya que los anticuerpos pueden persistir en la sangre durante largos periodos en oposición a los ligandos, que generalmente tienen esperanzas de vida cortas en la sangre. Los anticuerpos agonistas son armas útiles en el tratamiento de cáncer ya que los receptores pueden expresarse de forma más selectiva en tumores o pueden señalar solo la muerte celular o diferenciación en tumores. Asimismo, muchos sucesos inmunológicos positivos están mediados por medio de los receptores de la familia de TNF, por ejemplo, reacciones inflamatorias del huésped, producción de anticuerpos, etc., y por lo tanto los anticuerpos agonistas podrían tener efectos beneficiosos en aplicaciones no oncológicas, distintas.

Paradójicamente, la inhibición de una ruta puede tener también beneficio clínico en el tratamiento de tumores. Por ejemplo, el ligando Fas se expresa por algunos tumores y esta expresión puede llevar a la muerte de linfocitos positivos Fas, facilitando así la capacidad del tumor de evadir el sistema inmune. En este caso, la inhibición del sistema Fas podría permitir además que el sistema inmune reaccione al tumor de otras formas ahora que el acceso es posible (Green y Ware, 1997).

Un miembro de esta familia de receptores, el receptor linfotóxica-beta (LT β R) se une a la superficie de la linfotóxica (LT) que está compuesta de un complejo trimérico de cadenas de linfotóxica alfa y beta (Crowe et al, 1994). Este par receptor-ligando está implicado en el desarrollo del sistema inmune periférico y la regulación de sucesos en los nódulos linfáticos y el bazo en el sistema inmune maduro (Ware et al, 1995; Mackay et al, 1997; Rennert et al, 1996; Rennert et al, 1997; Chaplin y Fu, 1998). Una proteína de fusión de receptor de linfotóxica- β -inmunoglobulina puede hacerse entre LT β R e IgG (LT β R-Ig) que bloquea la señalización entre la superficie del ligando LT y el receptor con consecuencias en el estado funcional de las células dendríticas foliculares (Mackay y Browning 1998). Este bloqueo puede llevar además a disminuir la enfermedad autoinmune en modelos de roedor (Mackay et al, 1998, documentos U.S.S.N. 08/505.606 presentado el 21 de julio de 1995 y U.S.S.N. 60/029.060 presentado el 26 de octubre de 1996). Un segundo miembro de esta familia de receptores denominado HVEM por mediador de entrada del virus de herpes se une a un ligando denominado Light (Mauri et al, 1998) además del ligando LT heteromérico. La función de este receptor actualmente es desconocida, pero una proteína de fusión HVEM-Ig puede ser útil para el tratamiento de enfermedad inmunológica y este constructo se ha mostrado que afecta a los ensayos de función inmune in vitro (Harrop, J.A., et al, 1998).

A pesar de los avances clínicos de los miembros de la familia de TNF como se trata anteriormente, permanece una necesidad de un método para obtener los rendimientos deseados de fusiones de receptor Ig adecuados para el uso en un ámbito clínico. Por ejemplo, la proteína LT β R-Ig puede venir en dos formas cuando se expresa en células cos de mono o en células de ovario de hámster chino. Una forma se une al ligando con alta afinidad mientras que el otro no. Por lo tanto, hay una necesidad de un método para producir mayores rendimientos de la forma que se une con alta afinidad, mientras que se minimiza la presencia de la forma de menor afinidad.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la expresión de altos rendimientos de la forma de fusiones de proteína Ig que tienen alta afinidad de unión a su ligando, denominado en esta memoria como la forma "activa", la forma, cultivando huéspedes transformados con ADN que codifica las fusiones deseadas en un sistema de cultivo a una baja temperatura minimizando así la cantidad de formas de proteína mal plegadas o mal unidas por puentes. La invención se refiere a métodos de expresión de altos rendimientos en sistemas de expresión de mamíferos, cultivando huéspedes transformados a una temperatura de 27°C a 32°C.

En aún algunos ejemplos la descripción se refiere a métodos para la expresión de altos rendimientos de proteínas de fusión activas cultivando huéspedes transformados en un sistema de expresión de levadura a bajas temperaturas. Cuando las proteínas deseadas se expresan en levadura, las temperaturas preferidas son de 10°C a 25°C, más preferiblemente de 15°C a 20°C.

En la invención reivindicada, la fusión de proteína Ig comprende un miembro de la familia de receptor de TNF tal como un receptor de linfotóxica- β o un fragmento del mismo. De forma alternativa, los métodos pueden abarcar la expresión de una proteína de fusión deseada en cualquier sistema de expresión a bajas temperaturas, tal como un sistema de insecto o bacteriano.

En otros ejemplos, la descripción abarca las fusiones de proteína Ig activas que se obtienen mediante los métodos reivindicados, y las composiciones farmacéuticas que los comprenden. En aún otros ejemplos, la descripción se refieren a métodos de fabricación de preparados farmacéuticos que comprenden cultivar un huésped transformado con ADN que codifica una fusión de proteína Ig deseada en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 35°C, preferiblemente aproximadamente 27°C a aproximadamente 32°C, para expresar un alto rendimiento de proteínas de fusión activa, recuperadas las fusiones de proteína activa del sistema de cultivo, y combinando las proteínas de fusión activa recuperadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ejemplos preferidos, la fusión de proteína Ig comprende una linfotóxica- β o un fragmento de la misma, o HVEM, o un fragmento del mismo.

En aún otros ejemplos, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas obtenidas usando los métodos descritos.

La invención reivindicada en diferentes realizaciones se refiere a sistemas de expresión de mamíferos.

En ciertos ejemplos, la descripción se refiere a métodos para altos niveles de expresión de proteínas de fusión activas en levadura, cultivando a bajas temperaturas de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, más preferiblemente, aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C. Las fusiones activas obtenidas por este método de expresión en levadura, y composiciones farmacéuticas que comprenden estas fusiones activas también se abarcan. Los métodos de fabricación de preparados farmacéuticos se abarcan en la descripción que comprende fusiones de proteína Ig activas que comprenden cultivar una célula de levadura transformada con ADN que codifica

una fusión deseada a una baja temperatura, preferiblemente aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, más preferiblemente aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C. En las realizaciones más preferidas de todos los métodos de la invención, la fusión de proteína Ig comprende un receptor de linfotóxina- β , HVEM, o un fragmento del mismo.

- 5 En base a la descripción que está contenida en esta memoria, la presente invención proporciona un método para la expresión de altos rendimientos de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y que minimiza la expresión de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF inactivas, en donde las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas se unen a un ligando con alta afinidad, que comprende cultivar una célula huésped de mamífero transformada con molécula de ADN que codifica una proteína de fusión de miembro Ig de la familia del receptor de TNF deseada en un sistema de cultivo de célula de mamífero que tiene una temperatura de 27°C a 32°C.

- 10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para obtener las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y minimizar la expresión de proteínas de fusión de Ig inactivas, en donde las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas se unen a un ligando con alta afinidad, que comprende cultivar una célula huésped de mamífero transformado con molécula de ADN que codifica una proteína de fusión de miembro Ig de la familia del receptor de TNF deseada en medio de cultivo celular a una temperatura de 27°C a 32°C y aislar las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas del medio de cultivo usando cromatografía de interacción hidrófoba.

La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

20 Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: Esquema de la proteína quimérica de receptor-inmunoglobulina. El panel izquierdo muestra un dibujo de una molécula IgG típica, los dominios Fc están rellenos en negro, los dominios variables de la cadena pesada están coloreados en gris y las cadenas ligeras se dejan en blanco. El panel del medio contiene un dibujo esquemático de la molécula LT β R que incluye los dominios intracelular (gris oscuro) y extracelular (gris claro). El panel de la derecha representa un dibujo esquemático de la proteína de fusión LT β R-Ig.

- Figura 2: Esquema conceptual que muestra el probable defecto en la forma LT β R-Ig muerta, aunque los aminoácidos reales mal plegados o mal unidos por puentes no se han identificado.

- Figura 3: Análisis SDS-PAGE de LT β R-Ig humano antes y después del tratamiento con PNGasa F. Las pistas 1 y 2 contienen LT β R-Ig humano purificado del sobrenadante de cultivo de células CHO cultivadas a 37°C usando cromatografía de afinidad con Proteína A. La pista 3 muestra el mismo preparado después de tratamiento con PNGasa F para eliminar todos los oligosacáridos unidos a N. La pista 1 se opera bajo condiciones no reductoras, las pistas 2 y 3 se operan bajo condiciones reductoras. Las bandas de proteína se visualizan tiñendo el gel con Azul Brillante de Coomassie.

- Figura 4: Un análisis con gel de poliacrilamida SDS no reducida de la proteína que circula a través de unas pistas de la columna de afinidad con AGH1 y la proteína eludida con tampón fosfato a pH 3,5. La proteína antes de la purificación por afinidad se muestra en la pista del lado derecho del gel. Las bandas de proteína se visualizan tiñendo el gel con Azul Brillante de Coomassie.

- Figura 5: Capacidad de las fracciones de circulación (inferior) y eludida (superior) de la columna de afinidad con AGH1 para unirse a la linfotóxina de superficie. Los valores de intensidad de fluorescencia medios se derivaron de un análisis FACS como se describe. Los ejemplos de los perfiles FACS se muestran en la derecha donde la LT β R-Ig se compara con la unión de una proteína LFA-3-Ig de control.

- Figura 6: Cromatografía HIC analítica de LT β R-Ig humana usando una columna de éter POROS y un gradiente decreciente de sulfato de amonio. El pico 1 representa la forma inactiva, menor, el pico 2 la forma activa, mayor, de LT β R-Ig humana. Las fracciones que corresponden a los picos 1 y 2 respectivamente se acumularon y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 4-20% (panel insertado). La pista marcada "1" contiene el material "inactivo" del pico 1, la pista 2 el material "activo" del pico 2 del cromatograma HIC. El material de partida se muestra en la pista "L". La pista marcada "M" contiene marcadores de peso molecular.

- Figura 7: Cromatografía HIC preparativa (cromatografía de interacción hidrófoba) de LT β R-Ig humana usando una columna Pharmacia Source 15 PHE. El eluato de proteína A que contiene LT β R-Ig humana se ajusta con NaCl 5 M a una concentración final de NaCl 1,5 M, fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y se carga en la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de NaCl 1,5 M, fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y se eluyó con fosfato sódico 20 mM, pH 7,0. El eje X representa el tiempo en minutos, el eje Y muestra la absorbancia a 280 nm. Se muestra en la inserción de figura la imagen de un gel SDS-PAGE al 4-20% no reductor teñido con Azul Brillante de Coomassie de las acumulaciones de circulación (FT) y elución (E). Las posiciones de migración de las formas "viva" y "muerta" se indican con flechas.

- Figura 8: Análisis SDS-PAGE/transferencia de Western de LT β R-Ig humana secretado a partir de células CHO cultivadas a distintas temperaturas. Los sobrenadantes de células CHO cultivados a las temperaturas de cultivo

indicadas que contienen LT β R-Ig humana se analizaron por duplicado por electroforesis SDS-PAGE no reductora usando geles con gradiente del 4-20% seguido por transferencia de Western.

Figura 9: Efectos de la temperatura de cultivo en el porcentaje de material muerto en la cantidad total de LT β R-Ig humana secretada de las células de mamífero. Los matraces duplicados que contienen células CHO que secretan LT β R-Ig humana recombinante se cultivaron a las temperaturas indicadas y la LT β R-Ig humana secretada se purificó por cromatografía de afinidad con Proteína A. El porcentaje de la forma "inactiva" de LT β R-Ig humana se evaluó por duplicado usando cromatografía HIC analítica. El eje X representa la temperatura de cultivo, el eje Y muestra la cantidad de material "inactivo" expresada como un porcentaje de la cantidad total de LT β R-Ig humana secretada por las células.

Figura 10. Análisis SDS-PAGE no reductor de HVEM-Ig preparado a 28, 32 y 37°C: preparados purificados de proteína A de HVEM-Ig derivados de células cultivadas a 28, 32 y 37°C se mezclaron con tampón de muestra de SDS-PAGE no reductor y se hizo la electroforesis en geles prefabricados SDS-PAGE al 4-20%. Las bandas de proteína se visualizaron con azul de Coomassie. La banda marcada con una flecha representa HVEM-Ig no agregado. Las bandas de mayor peso molecular visibles en el gel corresponden a formas agregadas.

Figura 11: Análisis FACS de la unión de HVEM-Ig generado a 37°C frente a 32°C con Light de superficie y/o LT α / β . A) Unión de HVEM-Ig como una función de concentración a 293 células transfectadas con LIGHT humano que muestra que el material generado a 32°C se une mejor que el material a 37. B) Un ejemplo de los perfiles de FACS observados de la unión de HVEM-Ig a una concentración de 2 ug/ml con 293 células transfectadas con LIGHT. C) Un ejemplo adicional de la unión mejorada de HVEM-Ig generado a 32°C con la superficie de la línea de hibridoma de célula T II-23 que representa el complejo tanto de LIGHT como de linfotoxina- α / β de superficie.

Figura 12: Un análisis BIAcore de la unión de los ligandos tanto LIGHT como linfotoxina- α (LT α) a HVEM-Ig inmovilizado en chips BIAcore generada a tres temperaturas diferentes. Cada curva muestra un suceso de unión a una concentración de ligando y se emplearon las siguientes concentraciones: 30, 15, 7,5, 3,75, 1,87, 0,93, 0,47, 0,23, 0,11 y 0,0 ug/ml. Cada chip se cargó al mismo nivel RU que indica que se unieron cantidades iguales de receptor Ig.

Descripción detallada

Se hará referencia ahora en detalle a la invención reivindicada. Esta invención afecta a la capacidad para producir altos niveles de formas funcionales o activas de proteínas de fusión de inmunoglobulina de receptores en la familia de TNF. El éxito de las intervenciones clínicas con proteínas de fusión de receptor Ig necesita una presencia a largo plazo y la capacidad para tratar de forma crónica o un mínimo durante los brotes de enfermedad. De forma ideal, los preparados de dichas proteínas de fusión para uso humano no tendrán ninguna forma agregada, inactiva o mal plegada ya que su presencia reducirá la potencia del fármaco y las estructuras alteradas podrían obtener respuestas de anticuerpo que pueden facilitar el aclaramiento del fármaco reduciendo así su potencia. Además, los anticuerpos anti-receptor pueden reticular directamente al receptor natural en las superficies celulares activándolos así, es decir, los anticuerpos agonistas tales como los descritos en Browning et al 1996, JEM. Los anticuerpos agonistas activan el sistema y así los tratamientos de receptor Ig adicionales pueden ser menos efectivos o incluso dañinos. Por "proteínas de fusión de inmunoglobulina" se refiere a cualquier fusión de cualquier parte funcional del dominio extracelular de un polipéptido con cualquier parte de las regiones constantes de inmunoglobulina, por ejemplo, los dominios CH1, CH2 o CH3 o combinaciones de los mismos. Preferiblemente el polipéptido es un miembro de la familia de TNF de receptores. Las partes de la molécula Ig pueden derivar de cualquiera de los diversos isotipos de inmunoglobulina, que incluyen, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgM, IgA, etc. Por "familia de receptores de TNF" se refiere a cualquier receptor, tanto unido a la membrana de forma natural como secretado (como en el caso de osteoprotegerina), que tiene los patrones canónicos de unión por puentes de cisteína de la familia de TNF o cualquier receptor que se una a un miembro definido de la familia de TNF de ligandos (por ejemplo, Banner et al, 1993). La descripción en otros ejemplos se refiere a las fusiones de receptor Ig de la familia de TNF obtenidas por los métodos tratados en esta memoria, además de los preparados farmacéuticos que los comprenden.

La proteína LT β R-Ig se expresa de dos formas en células cos de mono o células de ovario de hámster chino. Una forma enlaza al ligando con alta afinidad, la forma "activa" mientras que la otra, la forma "inactiva" no. Esta mezcla de formas viva y muerta no se ha descrito anteriormente para ninguna de las proteínas de fusión de receptor Ig de TNF, sin embargo, la naturaleza de la forma inactiva no está clara. Las dos formas se descubrieron por la presencia de dos bandas en un análisis SDS-PAGE. El material expresado contiene considerable heterogeneidad de glicosilación; sin embargo, esta heterogeneidad lo más probablemente no da por resultado los problemas funcionales descritos aquí. Por ejemplo, cuando el receptor se expresa como una forma monomérica soluble que carece del dominio transmembrana y la región Fc de inmunoglobulina, se observan formas glicosiladas no unidas, mono y di unidas a N. Las formas tanto sencilla como doble glicosiladas pueden inmunoprecipitarse por BDA8, un anticuerpo que reconoce solo formas funcionales. Además, las formas purificadas por afinidad tienen heterogeneidad de glicosilación similar. Más probablemente, se especula que la expresión de una forma no anclada a la membrana lleva a alguna unión disulfuro aberrante que da por resultado reticulado inapropiado entre los dos brazos del dímero de receptor Ig.

La familia de receptores de TNF son generalmente 3-4 dominios repetidos en la parte de unión a ligando extracelular con aproximadamente 3 puentes disulfuro por dominio. Es concebible que el plegado inapropiado llevase tanto a patrón incorrecto de enlaces disulfuro como a la carencia de alguna formación de enlaces disulfuro (ilustrado esquemáticamente en la figura 2). En el caso de una proteína de fusión del receptor Ig, parece que el plegado temprano del dominio Fc permite su posterior dimerización lo que lleva a las dos cadenas de LTBR, es decir, los dos brazos del receptor, a mucha proximidad. Si los dominios del receptor no han completado aún su plegado, entonces hay potencial para que sulfhidrilos libres se emparejen entre los brazos, es decir, formación de puentes entre brazos. Dicho plegado incorrecto puede ocurrir, o puede resultar la aleatorización de disulfuro entre sulfhidrilos libres yuxtapuestos al lado de uniones disulfuro ya formadas llevando en ambos casos a errores de plegado. También es posible que se dé plegado incorrecto en un brazo, es decir, errores de plegado intra-brazo, aunque dichos errores no darían por resultado una forma radicalmente diferente de la molécula final. En este caso, las formas activa e inactiva no pueden resolverse fácilmente usando métodos de medida convencionales.

Finalmente, en el receptor TNFR55, el cuarto dominio, es decir, el dominio más cercano a la región transmembrana se ha demostrado que es crítico para la unión al ligando cuando el receptor se expresó como una proteína de fusión de Ig (Marsters et al, 1992). Este dominio sería crítico para muchos receptores de TNF. Otro estudio de TNFR55 mostró que era crítico solo en el contexto de la proteína de fusión de Ig, y que la forma de membrana que carece del cuarto dominio estaba activo totalmente en la unión con ligando de TNF (Corcoran et al, 1994). Sin embargo, más recientemente, análisis cristalográficos han apuntado a posibles funciones críticas asociadas con el cuarto dominio (Naismith et al, 1996). El cuarto dominio está relativamente conservado entre especies pero carece de contactos directos con el ligando (Banner et al, 1993). Es posible que la formación de puentes entre brazos en esta región entre los dos cuartos dominios que están al lado de la bisagra y los dominios Fc CH2+CH3 no alterarían de forma apreciable la forma global de la molécula y por tanto puede ser invisible en métodos de separación basados en tamaño. Sin embargo, esta molécula mostraría unión a ligando disminuida. Los receptores que tienen solo 3 dominios podrían comportarse de una forma similar.

Reducir la temperatura durante el cultivo celular dio por resultado que significativamente menos de la forma más pequeña mal plegada (es decir, la forma inactiva) se secretara. Esta mejora es presumiblemente debido a una velocidad de plegado reducida del polipéptido que permitiría plegar durante más tiempo los dominios individuales de la parte LTBR antes del montaje de la proteína de fusión del receptor Ig en la forma de dímero esperada. La temperatura absoluta necesaria para ralentizar el proceso de plegado es dependiente del huésped. Para células de mamífero (es decir, CHO), el método reivindicado se da a temperaturas de 27°C a 32°C. Los métodos también pueden usarse en sistemas de cultivo de levadura. El cultivo de levadura necesita cultivarse a temperaturas de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C para alcanzar beneficio significativo.

La explotación de la invención reivindicada permite el correcto plegado de fusiones de proteína Ig activas. Puede ser deseable, en algunas circunstancias, permitir el crecimiento celular a temperaturas mayores, por ejemplo, 37°C a 43°C, durante el que solo un nivel muy bajo de expresión del gen clonado se dará. Después del periodo de crecimiento deseado, las fusiones pueden expresarse a las bajas temperaturas, para producir un rendimiento aumentado de fusiones activas. Las bajas temperaturas en sistemas de mamífero, como se trata anteriormente, son 27°C a 32°C.

Así, los métodos reivindicados, disminuyendo la temperatura a la que se expresan las fusiones de proteína Ig, permiten a un experto en la técnica regular el plegado tanto de las proteína como de las partes de Ig de la proteína deseada.

De forma adicional, usando el método reivindicado que incluyen las técnicas de cromatografía de afinidad y/o convencional, se puede ahora purificar las fracciones activas suficientemente para usar las proteínas quiméricas para bloquear la función inmunológica en varios entornos clínicos. Además, usar los métodos reivindicados que tienen condiciones de cultivo celular a baja temperatura (es decir $\leq 32^\circ\text{C}$ para CHO y $\leq 25^\circ\text{C}$ para levadura), es ahora posible preparar sobrenadante del cultivo que está altamente enriquecido en la forma activa mayor de LTBR-Ig humana. Además, es posible que otros miembros de esta familia de receptores sufran problemas similares. Por ejemplo, se ven dos bandas similares en SDS PAGE no reductor para el TNFR55-Ig (también denominado el TNFR p55 o p60). De forma similar, las propiedades de otro receptor de la familia de TNF denominado HVEM se mejoran por secreción a menores temperaturas. Este receptor puede formar un ejemplo de un error de plegado intra-brazo ya que no hay diferencias de tamaño obvias en los materiales hechos a diversas temperaturas. No obstante, a pesar del mecanismo, los métodos reivindicados que han dado por resultado un mayor porcentaje de proteínas de fusión más activa a temperaturas de secreción disminuidas en preparados del se y otro miembro de la familia de TNF.

Ejemplos

Ejemplo 1. mAb que reconoce de forma específica la forma viva de LTBR-Ig humana

La proteína LTBR-Ig (Figura 1) cuando se secreta de células COS o CHO transfectadas con un plásmido puede purificarse usando métodos cromatográficos de afinidad basados en proteína A estándar. La proteína purificada consiste en dos bandas espaciadas cercanas a aproximadamente 100 kDa en un gel de acrilamida de SDS no

reductor (Figura 3). Las dos bandas difieren en aproximadamente 5 kDa en tamaño aparente. Cuando la proteína se reduce, se resuelven esencialmente dos bandas a aproximadamente 50 kDa que resultan de la glicosilación heterogénea (Figura 3). Las dos bandas observadas bajo condiciones no reductoras, sin embargo, no resultan directamente de las diferencias de glicosilación que dan lugar al par de bandas reducidas. Usando un panel de anticuerpos monoclonales a la LTβR humana, se mostró que los anticuerpos del grupo I, es decir AGH1 y BDA8 reconocen solo la forma de PM grande del receptor (Tabla I; todos los datos excepto la selectividad para las bandas superior e inferior se tomaron de Browning et al, 1996). Los anticuerpos de este grupo enlazan directamente a la región de unión del ligando como se evidencia por la observación de que un fragmento Fab de BDA8 puede aún bloquear. Los mAb del grupo II pueden también bloquear la unión del ligando, sin embargo, en ensayos biológicos, estos mAb muestran comportamiento agonista y antagonista mezclados. Cuando se hace una columna de afinidad de estos mAb (AGH1 se usó en estos experimentos) y aplica la mezcla de formas grande y pequeña de la LTβR-Ig, la forma menor del receptor circula y la forma mayor se pega a la matriz de la columna. La elución a bajo pH proporciona un preparado puro de la forma grande (Figura 4). Las dos fracciones se ensayaron por su capacidad para enlazar a la superficie de células de hibridoma de célula T II-23 activado por éster de forbol, es decir, células que expresan el complejo de linfotóxina de superficie (como se describe en Browning et al, 1995), y solo la fracción que se une al mAb era capaz de enlazar a la linfotóxina de superficie. La fracción de circulación, es decir, la banda de menor PM estaba completamente inactiva (Figura 5). Específicamente, los sobrenadantes de células CHO transfectadas de forma estable con el constructo LTβR-Ig se pasaron sobre una columna de proteína A para aislar la proteína. La proteína pura se eluyó con tampón de fosfato sódico 25 mM a pH 2,8 y las fracciones que contenían proteína se neutralizaron con volumen 1/10 de fosfato sódico 0,5 M, pH 8,6. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo en un volumen de 0,25 ml con 3 ug de LTβR-Ig y 4 ug de mAb anti-LTβR seguido de captura del mAb con gotas de KappaLock sefarosa que reconocen solo la cadena kappa en el mAb de ratón y no el dominio Fc humano. Las gotas se eliminaron por centrifugado y el sobrenadante se despejó de inmunoglobulina restante con sefarosa de proteína A. Las gotas se trataron con tampón de muestra de SDS PAGE (agente no reductor) y el tampón se cargó en geles de SDS PAGE. Los geles se operaron y se transfirieron en Hybond y se hizo transferencia de Western con un fragmento Fc de IgG anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (mAb de LTβR seguido por IgG-HRP de anti-ratón y detección por quimioluminiscencia de HRP (Amersham).

Para explotar la capacidad de AGH1 que reconoce exclusivamente la forma activa de LTβR-Ig; se preparó una columna de afinidad con AGH1 usando sefarosa activada con CNBr (Pharmacia, Piscataway, NJ) según el protocolo de los fabricantes. La columna se lavó de forma extensa con PBS y la LTβR-Ig purificada con proteína A se aplicó y la circulación se recogió. La columna se lavó con PBS y después se eluyó con fosfato sódico 25 mM, pH 2. Las fracciones que contenían eluyente se neutralizaron inmediatamente como se describe anteriormente. Las concentraciones de proteína se determinaron por absorbancia a 280 nm asumiendo que una disolución 1 OD es igual a 1 mg/ml. Las acumulaciones de circulación y elución que contenían LTβR-Ig se ensayaron para la unión por análisis FACS como se describe (Browning et al, 1995). La fracción de circulación no mostró tinción de FACS en células que expresan LT de superficie mientras la acumulación de elución retuvo toda la actividad de unión.

Ejemplo 2. Separación cromatográfica convencional de componentes vivos y muertos de LTβR-Ig humana.

Diferencias estructurales potenciales entre los componentes de PM grande y pequeño identificados anteriormente se explotan en el diseño de métodos de separación usando etapas de cromatografía convencional. Como un ejemplo, la proteína puede medirse por filtración en gel en PBS para obtener la separación parcial de las formas mayor y menor. Estos preparados pueden entonces aplicarse de nuevo a la misma columna para obtener preparados de las formas mayor y menor de LTβR-Ig humana que son mayores que el 90% enriquecido en los respectivos componentes. De forma alternativa, la cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) puede emplearse para alcanzar el mismo resultado. La mezcla de proteína se diluye con sulfato de amonio, se carga en la columna de HIC y los componentes grande y pequeño se eluyen de forma diferencial con un gradiente de sal decreciente. Bajo estas condiciones, la separación de la línea base de los dos componentes de LTβR-Ig humana se obtiene (Figura 6). Estos métodos además del método de inmunoafinidad descrito anteriormente son útiles para preparar cantidades de mg de los preparados grande y pequeño de LTβR-Ig humana pero dejan mucho que desear para la preparación de grandes cantidades de estos componentes para uso farmacéutico. Los solicitantes han inventado un nuevo método adaptando el método de HIC a resinas que pueden obtenerse a granel y han identificado condiciones de cromatografía que permiten que la forma pequeña del material de LTβR-Ig humana circule a través de la columna mientras el componente grande se retiene y puede eludirse de forma selectiva (Figura 6). El material eludido puede someterse a una etapa de finalización tal como cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico para eliminar el material agregado y otras impurezas y, que después de la formulación en un tampón fisiológico adecuado puede usarse para un trabajo in vivo. El primer ejemplo posterior (A) describe las condiciones específicas que se usaron para evaluar analíticamente la cantidad de material inactivo en un preparado de LTβR-Ig. El segundo ejemplo (B) describe el proceso de purificación preparativo que da por resultado un preparado de LTβR-Ig altamente enriquecido en el componente activo.

A) La cromatografía de interacción hidrófoba analítica (HIC) puede usarse como un ensayo cuantitativo para evaluar las cantidades de LTβR-Ig inactiva.

La resolución de línea base de los componentes más pequeño inactivo y más grande activo de LTβR-Ig humana recombinante se alcanzó en una columna de éter/m de Perseptive Biosystems Poros (4,6x100 mm, núm. de

catálogo P091M526) equilibrada en sulfato de amonio 1,5 M y la posterior elución en un gradiente decreciente de sulfato de amonio. Los preparados de LT β R-Ig se diluyeron a una concentración de 0,1 mg/ml y se llevaron a una composición de tampón final de sulfato de amonio 1,5 M, fosfato sódico 20 mM, pH 9 (tampón A). Una parte (1 ml que contiene 100 μ g de proteína) se cargó en la columna de éter/m Poros. La columna se lavó con 8,3 ml de tampón A. Los componentes activo e inactivo se eluyeron diferencialmente con un gradiente lineal (volumen de gradiente total de 16,6 ml) de tampón A al 100% a tampón B al 100% (fosfato sódico 20 mM, pH 9) seguido por un lavado de 16,6 ml de tampón B. El efluente de columna se monitorizó por absorbancia a 214 nm. El procedimiento total se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un caudal de columna de 1 ml/min. El perfil de elución de un cromatograma HIC analítico representativo se muestra en la Figura 5. El pico 1 contiene la fracción inactiva y el pico 2 la fracción activa de LT β R-Ig. Para cuantificar la contribución relativa de las dos formas, las áreas de pico se integraron usando el software de integración Vison de instrumentos Perseptive.

B) Purificación preparativa de LT β R-Ig recombinante humana.

Clarificación y concentración de medios acondicionados: Los restos celulares se eliminaron de 10 L de los medios acondicionados cosechados de células CHO que secretan LT β R-Ig recombinante usando filtración final muerta a través de una cápsula de filtro Calyx de 5 pies cuadrados (46,45 m²) de polipropileno de 5 μ (Microseparations Inc, Westborough, MA) seguido de un cartucho de filtro de 4 pulgadas (10,16 cm) Opticap de 0,2 μ (Millipore Corp., Bedford, MA). Los medios clarificados se concentraron por ultrafiltración a aproximadamente 1 L usando tres cartuchos de Ultrafiltración Espiral S1Y30 (Amicon, Beverly, MA) conectados en serie.

Cromatografía de afinidad de proteína A: El medio acondicionado concentrado se pasó por gravedad a través de una columna de flujo rápido de sefarosa de proteína A de 10 ml (Pharmacia) a 4°C. La columna se lavó con 50 ml de PBS, 50 ml de PBS que contiene NaCl 0,5 M, y 50 ml de PBS. Para eliminar IgG bovino contaminante, la columna se lavó con 50 ml de fosfato sódico 25 mM, pH 5,5. La LT β R-Ig unida se eluyó por gravedad con fosfato sódico 25 mM, NaCl 100 mM, pH 2,8 en fracciones de 3 ml y se neutralizó inmediatamente con 0,3 ml de fosfato sódico 0,5 M, pH 8,6. Las fracciones que contienen proteína se identificaron por espectroscopia de absorción, se acumularon y se almacenaron a -70°C.

Cromatografía de interacción hidrófoba: La acumulación de elución de proteína A (40 ml a una concentración de 2,5 mg/ml) se diluyó con 40 ml de cloruro sódico 3 M, fosfato sódico 40 mM a pH 7 y 20 ml de cloruro sódico 1,5 M, fosfato sódico 20 mM a pH 7 (todas las disoluciones estuvieron a temperatura ambiente). La acumulación diluida se cargó en una fuente PH15 de 10x100 mm (7,8 ml) (Pharmacia, Piscataway NJ) a un caudal de 2 ml/min. La columna se lavó con 79 ml de cloruro sódico 1,5 M, fosfato sódico 20 mM a pH 7 a un caudal de 20 ml/min. La proteína unida se eluyó con fosfato sódico 20 mM a pH 7 a un caudal de 2 ml/min. La absorbancia del efluente se monitorizó a 280 nm y se recogieron fracciones de 9 ml. Las fracciones de elución que contenían proteína se identificaron por espectroscopia de absorción de UV, se acumularon y se almacenaron a -70°C. La Figura 7 representa un perfil de elución de HIC típico. Bajo estas condiciones, el material inactivo circula a través de la columna y el material activo se une a la resina. La inserción de la figura 7 contiene un barrido del análisis SDS-PAGE NR teñido de azul de coomassie de las acumulaciones de aplicación y elución, respectivamente.

Cromatografía por exclusión de tamaño: Aproximadamente 100 ml (1,3 mg/ml) de la acumulación de elución de HIC que contenía los componentes activos de LT β R-Ig se concentraron por ultrafiltración a 9 ml usando un concentrador centriprep30 (Amicon, Beverly, MA). El concentrado (10,3 mg/ml) se cargó en una columna graduada preparativa Superosa-6 de 1,6x100 cm (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equilibrada en PBS a un caudal de 1 ml/min. El efluente se recogió en fracciones de 3 ml. Las fracciones que contenían proteína se identificaron por espectroscopia de absorción de UV. Las fracciones seleccionadas se analizaron por contenido de agregado a una carga de 3 μ g/pista usando electroforesis en gel de SDS-PAGE NR. Las fracciones con agregado visible mínimo se acumularon y se almacenaron congelados a -70°C.

De esta forma, puede prepararse LT β R-Ig que contiene cantidades mínimas del componente LT β R-Ig inactivo que está presente en los medios de cultivo en bruto.

Ejemplo 3. Condiciones de fermentación a baja temperatura enriquecidas para el componente activo grande de LT β R-Ig humana durante la etapa de cultivo celular.

Bajo condiciones de cultivo celular de mamífero convencionales, se secreta LT β R-Ig humana como una mezcla de aproximadamente 50% de componentes pequeños y 50% de componentes grandes. El uso de células de insecto infectadas con baculovirus para expresar la misma proteína da por resultado niveles drásticamente reducidos de la forma pequeña. Como las células de insecto se cultivan a 28°C, se exploró si LT β R-Ig humana secretada de células de mamífero cultivadas a baja temperatura tendrían una relación alterada de formas pequeña y grande. Se muestran en la Figura 8 los sobrenadantes de las células CHO que secretan LT β R-Ig humana cultivadas en matraces T a 28, 30, 33, 35 y 37°C analizados por transferencia de Western. Las formas grande y pequeña (indicadas por flechas) están presentes en los cultivos hechos crecer a 33, 35 y 37°C. Puede verse muy poca evidencia de la forma pequeña en las pistas que contienen sobrenadante de cultivo de células cultivadas a 30 y 28°C. Así, la disminución de la temperatura durante el cultivo celular reduce dramáticamente la cantidad de la forma inactiva pequeña de LT β R-Ig humana. Para cuantificar la relación entre la temperatura de cultivo celular y la extensión del

enriquecimiento para la forma activa mayor de LTβR-Ig humana, se instalan matraces de cultivo duplicados y se cultivan a temperaturas que oscilan de 28-37°C en intervalos de un grado. Las muestras de LTβR-Ig humana purificadas por afinidad con proteína A se analizaron por cromatografía HIC analítica para cuantificar la relación de los componentes pequeño y grande de LTβR-Ig humana presentes en los preparados derivados de células cultivadas a las diferentes temperaturas. Como se muestra gráficamente en la Figura 9, la cantidad de la banda inferior disminuye rápidamente aproximadamente 5 veces cuando la temperatura de cultivo se disminuye de 37 a 32°C. Disminuir la temperatura de cultivo a 28°C reduce la cantidad de la forma inferior aunque de un modo mucho menos dramático. Estos resultados muestran que reducir la temperatura de cultivo en solo unos pocos grados desde 37°C disminuye dramáticamente la cantidad del componente de pm más pequeño, aumentando así el rendimiento del componente activo mayor de LTβR-Ig humana. En base a estos datos, las temperaturas de cultivo de 32 a 28°C se seleccionaron para ensayar si estas observaciones podrían duplicarse a una gran escala bajo condiciones que serían adecuadas para la fabricación usando células CHO que secretan LTβR-Ig humana recombinante que se habían adaptado al crecimiento en suspensión. Para estos experimentos, las células se cultivaron a densidades que se aproximan a 2×10^5 células/ml a 37°C, el cultivo se diluyó con aproximadamente 4 volúmenes de medios de crecimiento y se incubó a 32°C hasta que la viabilidad celular cayó por debajo del 80%. Disminuir la temperatura a 28°C durante la fase de producción también da por resultado niveles significativamente más bajos del componente "muerto" en la cosecha final. Fue interesante anotar que mientras el número celular no aumentó mucho durante la fase de producción a 28 o 32°C, se obtuvo un aumento de varias veces en la valoración de producto sobre el cultivo hecho crecer exclusivamente a 37°C en los medios acondicionados cosechados. Las condiciones específicas que se usaron en el proceso a 32 y 28°C se describen a continuación.

Los datos iniciales sugieren que disminuir la temperatura de cultivo da por resultado beneficios similares en otros sistemas huésped tales como levadura. Es interesante que en la levadura, los efectos beneficiosos de la producción a baja temperatura se observan a temperaturas mucho menores que en las células de mamífero. La levadura cultivada a 30°C produce predominantemente la forma inactiva, los cultivos hechos crecer a 25°C contienen aproximadamente una mezcla igual de las formas inactiva y activa y los cultivos fermentados a 16°C producen predominantemente la forma activa de LTβR-Ig humana. Estas observaciones sugieren que la fermentación a baja temperatura dará por resultado rendimientos significativamente mayores del componente activo de la LTβR-Ig humana en cualquier sistema huésped secretor. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las temperaturas de producción óptimas para cada sistema.

Aquí se proporciona un ejemplo detallado de cómo este proceso se aplicó a la producción de LTβR-Ig. Se desarrollaron dos métodos de cultivo celular que toman ventaja del hecho de que reducir la temperatura de cultivo celular reduce significativamente la cantidad de componentes inactivos presentes en LTβR-Ig secretados de células huésped. Un beneficio adicional inesperado de fermentación a baja temperatura es una mejora de varias veces en la valoración cuando se compara con operaciones de fermentación tradicionales llevadas a cabo a 36-37°C. La tabla II resume los rendimientos comparativos y las cantidades relativas de componentes de LTβR-Ig inactivos obtenidos con dos líneas celulares diferentes transfectadas con constructos LTβR-Ig diferentes que varían en la extensión de glicosilación (no relacionado con la idea de este ejemplo).

Proceso de cultivo celular a 32°C: Las células CHO que secretan LTβR-Ig humana que se habían adaptado al crecimiento en la suspensión se cultivaron en medios de crecimiento DME/HAM's F-12 (véase la Tabla III posterior) suplementados con FBS al 10%, 140 mg/L de estreptomycin y 50 mg/L de gentamicina. Para el aumento progresivo, dos matraces de agitación de 750 ml se inocularon a aproximadamente 2×10^5 células/ml en medios de crecimiento. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% a una densidad de aproximadamente 3×10^6 células/ml. Las suspensiones celulares de ambos cultivos de agitación se combinaron para inocular el biorreactor a mayor escala que contenía aproximadamente 10 L de medios de crecimiento. Los cultivos se oxigenaron a 11% de O₂ y se cultivaron durante tres días a 37°C a una densidad de aproximadamente 2×10^6 células/ml. Este cultivo se usó para inocular el biorreactor de producción que contenía 33 L de medio de crecimiento a una densidad de $6,4 \times 10^5$ células/ml. El biorreactor de producción se cultivó entonces durante 8 días a la beneficiosa temperatura de 32°C con la velocidad de dispersión de oxígeno fija al 11% de O₂. La densidad celular en el día de cosecha (día 8) fue aproximadamente 2×10^6 células/ml con una disponibilidad de aproximadamente 60%. Bajo estas condiciones, se alcanzó una valoración de 12 mg/L de LTβR-Ig que fue dos veces mayor que cuando las mismas células se cultivaron a la temperatura tradicional de 37°C. La cantidad relativa del componente inactivo en el preparado de LTβR-Ig fue 17% que representó una disminución de más del 60% cuando se compara con el producto obtenido de un cultivo a 37°C.

Proceso de cultivo celular a 28°C: Las células CHO que secretan LTβR-Ig humana que se habían adaptado al crecimiento en suspensión se cultivaron en medios de crecimiento DME/HAM's F-12 (véase la tabla III posterior) suplementados con FBS al 10%, 140 mg/L de estreptomycin y 50 mg/L de gentamicina. Para el aumento progresivo, se inocularon dos matraces de agitación de 800 ml a aproximadamente 2×10^5 células/ml en medios de crecimiento. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C en un 5% de CO₂ a una densidad de aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células/ml. Las suspensiones celulares de ambos cultivos de agitación se combinaron para inocular al biorreactor a mayor escala que contenía aproximadamente 10 L de medios de crecimiento. El cultivo se oxigenó a 11% de O₂ y se cultivó durante dos días a 37°C a una densidad de aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml. Este cultivo se usó para inocular dos biorreactores de producción de 40 L y uno de 10 L a densidades celulares de partida de $2,5-3 \times 10^5$ células/ml usando una relación de separación de 1:9. Los biorreactores de producción se cultivaron a 37°C y se

5 oxigenaron al 11% de O₂ hasta que se alcanzó una densidad celular de aproximadamente 2x10⁶ células/ml (dos días). Al final del día dos, la temperatura del biorreactor se disminuyó a 28°C y los biorreactores se cultivaron durante unos 5 días adicionales. En el día 7, a densidades celulares de aproximadamente 3x10⁶ células/ml y viabilidad celular de >75%, los biorreactores se cosecharon y los medios acondicionados se procesaron como se describe anteriormente. Bajos estas condiciones, se alcanzó una valoración final de aproximadamente 20 mg/L de LTβR-Ig que representa un aumento de 3,3 veces sobre la valoración que se obtuvo cuando las mismas células se cultivan a 37°C. La proporción relativa del componente inactivo fue 10% que representa una disminución del 80% sobre el material preparado a 37°C.

Ejemplo 4: Alteraciones en el dominio Fc para minimizar las formas muertas durante la producción.

10 En base a la hipotética explicación de porqué resultan moléculas muertas en estos preparados, se podría predecir que ralentizando el tiempo antes de que los dominios Fc dimerizaran aumentaría la fracción de dominios receptores plegados correctamente. Se exploraron varios métodos para alcanzar este resultado. Es posible que diferentes dominios Fc de Ig pudieran plegarse a velocidades diferentes, sin embargo el intercambio del dominio IgG1 por un dominio IgG4 no cambió la relación vivo muerto. En segundo lugar, los residuos de cisteína en la región bisagra que reticulan las dos cadenas peptídicas se eliminaron del dominio Fc de IgG1 por mutagénesis. Los dominios Fc pueden dimerizar bien en ausencia de formación de disulfuro bisagra pero la velocidad puede ser más lenta en su ausencia. La sustitución de los dos residuos de cisteína por alanina dio por resultado una cantidad disminuida de forma muerta como se cuantificó por cromatografía SDS-PAGE y HIC de manera que donde la LTβR-Ig de tipo salvaje contendría 50 y 5% de formas muertas a 37 y 28°C, la supresión de las cisteínas de la bisagra de IgG1 llevan a 20 y 5% de forma muerta cuando se produce a estas temperaturas respectivas. Por lo tanto, la modificación de la bisagra por sustitución de ambos residuos de cys puede mejorar la calidad de un preparado y, además, es posible que la sustitución de solo un residuo cys pudiera tener un efecto beneficioso. Dichas modificaciones genéticas podrían reducir el porcentaje de forma muerta recurriendo a métodos de producción a baja temperatura.

Ejemplo 5: Supresión de puentes de cisteína para corregir los problemas de plegado

25 Típicamente, es muy difícil definir las rutas de plegado utilizadas por una proteína para obtener la forma correcta final. No obstante, algunos puentes disulfuro en la familia del receptor de TNF son inusuales y pueden no necesitarse para el estado plegado final. Estos puentes son buenos candidatos para la mutagénesis. Uno de dichos puentes en el tercer dominio de LTβR-Ig se eliminó por mutagénesis dirigida al sitio convencional de cisteínas 101 y 108 a alaninas (usando la numeración de la secuencia definida en Ware et al, 1995) llevó a una relación mejorada de material muerto/vivo como es evidente por SDS-PAGE. Con LTβR-Ig de tipo salvaje típicamente muestra la presencia de 50 y 5% de forma muerta cuando se produce a 37 y 28°C respectivamente. La forma mutante con el puente de disulfuro de cisteína suprimido tuvo 20 y 5% de forma muerta cuando se produjo a estas temperaturas.

Ejemplo 6: Uso de temperaturas menores para mejorar la calidad de un preparado de HVEM-Ig

35 El mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) es un receptor de la familia de TNF relacionado con la LTβR y enlaza firmemente al ligando LIGHT firmemente y débilmente al ligando linfotóxina-α (LTα) (Mauri et al, 1998). El HVEM humano se preparó como una proteína de fusión de Ig por amplificación PCR del dominio extracelular y se condensó a la región CH2 y CH3 de IgG1 como se describe para LTβR-Ig (Crowe et al, 1994). El constructo se insertó en un vector denominado CH269 (Chicheportiche et al, 1997) para expresión transitoria en la línea celular del riñón embrionario humano 293 con alta expresión del vector de copia usando el sistema EBNA (células 293-E). Se recogieron los sobrenadantes y HVEM-Ig se purificó usando cromatografía de afinidad a Proteína A y elución a bajo pH. Se preparó LTα recombinante a partir de células de insecto como se describe (Browning et al, 1996a). Se preparó LIGHT humano soluble recombinante por amplificación PCR del ADNc entero usando ARN de células I123 activas que dan la región de codificación de la secuencia descrita por Mauri et al, 1998. El dominio de unión al receptor de LIGHT se amplificó por PCR y se condensó en la secuencia líder del factor alfa de apareamiento y se expresó esencialmente como se describe para otras proteínas relacionadas (Browning et al, 1996). Una etiqueta FLAG y secuencias de aminoácidos espaciadoras (G₄S)₃ se insertaron entre el líder y el dominio de unión al receptor de manera que el LIGHT secretado poseería una secuencia FLAG N-terminal. El constructo codificó la siguiente molécula:

**"MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFPFSNSTN
NGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKR. . EADYKDDDDNNGGSGGGSGGGSKELNPA AHLTGA
NSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHGDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTI
THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDER
LVRLRDGTRS YFGAFMV"**

50 donde los dos puntos indica el extremo N esperado de la proteína madura que podría procesarse adicionalmente por eliminación de los dos siguientes aminoácidos (EA). La proteína se purificó del sobrenadante por cromatografía de afinidad sobre una columna mAb anti-FLAG y elución con o bien pH bajo o quelación con calcio. Se insertó además

LIGHT de longitud completa en un vector CH269 para la expresión en la superficie de células 293-E como se describe (Chicheportiche et al, 1997). Se han descrito métodos de unión FACS para la detección del receptor Ig a superficies celulares y métodos BIAcore para medir la unión de ligandos solubles a receptor Ig inmovilizado (Mackay et al, 1997). La tecnología BIAcore proporciona medidas a tiempo real de proteína unida a los chips (es decir, el receptor).

Las células CHO que expresan HVEM-Ig se cultivaron para confluir a 37°C en botellas de cultivo rotatorias usando medios de crecimiento suplementados con FBS al 10%. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio gastado se intercambi6 con medios de crecimiento fresco y los cultivos se incubaron a 37, 32 y 28°C. Los cultivos a 28 y 32°C se cosecharon una vez a la semana, el cultivo a 37°C cada 4 d6as. El HVEM-Ig secretado se purific6 usando cromatograf6a de afinidad a Prote6na A como se describe. Los preparados purificados se almacenaron a -70°C hasta el an6lisis. Cuando HVEM-Ig se produjo a 28, 32 y 37°C y se purific6, todos los preparados se comportaron de forma similar en el an6lisis SDS-PAGE (figura 10) sugiriendo que no ocurrieron grandes alteraciones en la prote6na. Por lo tanto, si se diera un plegado/formaci6n de puente disulfuro aberrante, ser6a o bien intra-brazo o se dar6a cerca de la regi6n bisagra del dominio Fc, es decir, formaci6n de puentes entre brazos y por lo tanto no afect6 de forma apreciable la forma total de la mol6cula en SDS-PAGE. La capacidad del receptor Ig para unirse a LIGHT expresado en c6lulas 293-E o LIGHT en c6lulas II23 activas se evalu6 en ensayos de uni6n FACS (figura 11). En ambos tipos de c6lulas, la capacidad de HVEM-Ig para unirse al ligando de superficie celular se mejor6 bruscamente 2-3 veces en la expresi6n a 32°C. Usando tecnolog6a BIAcore, se observ6 que cuando se cargaban chips BIAcore con HVEM-Ig a niveles similares (los valores RU reflejan la cantidad de prote6na en el chip), el HVEM-Ig producido a menores temperaturas uni6 m6s ligando que las prote6nas producidas a las temperaturas m6s altas (figura 12). Este resultado se obtuvo si LIGHT o LT α era el ligando. Las curvas de uni6n a BIAcore muestran los sucesos de uni6n on y off a tiempo real y puede verse que los sucesos de uni6n fueron similares a pesar de la temperatura de producci6n. Por lo tanto, una parte del preparado est6 efectivamente muerto y esta proporci6n se minimiza mediante menores temperaturas de producci6n. Se especula que la menor temperatura ha corregido un problema de plegado aberrante y mejorado el porcentaje de mol6culas vivas incluso aunque no se pueda observar directamente la fracci6n de mol6culas muertas. Las t6cnicas cromatogr6ficas de afinidad como se perfilan anteriormente podr6an servir para resolver las formas viva/muerta despu6s de la optimizaci6n del preparado disminuyendo las temperaturas de crecimiento y o mutag6nesis de varias ciste6nas o bien en la bisagra o en el receptor en s6 mismo para evitar el plegado incorrecto.

Ejemplo 7: Esquemas gen6ricos para minimizar las formas muertas de otras prote6nas de fusi6n del receptor Ig de la familia de TNF

La mayor6a de los receptores de la familia de TNF se han preparado como constructos de prote6na de fusi6n con dominios Fc de inmunoglobulina:

Referencia

35	TNF-R p55	(Loestcher et al, 1991, Marsters et al. 1992; Ashkenazi et al, 1991)
	TNF-R p75	(Mohler et al, 1993)
	LT β -R	(Crowe et al, 1994)
	Fas	(Suda et al, 1993)
	CD27	(Goodwin et al, 1993)
40	CD30	(Smith et al, 1993)
	CD40	(Fanslow et al, 1992)
	Ox40	(Baum et al, 1994)
	4-1BB	(Alderson et al, 1994)

HVEM (Mauri et al, 1998)

45 En varios casos, lo m6s notablemente, Fas-Ig y CD40-Ig por ejemplo Fanslow et al, 1992, las quimeras son pobremente activas respecto a las formas Fc solubles de los dos receptores de TNF. Es posible que algunos de estos preparados sean mezclas de formas vivas y muertas en relaciones variables. Una forma muerta se refiere simplemente a una mol6cula que se une con una afinidad esencialmente menor (10-1000 veces) que la forma viva, es decir, no carecer6a completamente de actividad de uni6n, pero en vez de eso tiene una afinidad reducida por el
50 ligando respecto a la forma de alta afinidad encontrada en las c6lulas de forma natural. Las uniones disulfuro entre brazos de receptor o intra-brazo de receptor aberrantes pueden darse llevando a una prote6na menos activa.

Con cualquiera de estos receptores u otros como receptores a6n no definidos, se preparar6a un panel de mAb anti-receptores mediante tecnolog6as convencionales. Esos anticuerpos capaces de bloquear la uni6n del ligando al

receptor preferiblemente como se evalúa usando un ensayo de unión al ligando al receptor nativo en una superficie celular (aunque otros métodos que usan formas de receptor recombinante pueden ser suficiente) se usarían para formar columnas de afinidad. La preparación de la mezcla de formas de receptor Fc vivas o muertas pasaría sobre la columna y se recogió la circulación. El material que se une a la columna se eluiría con un tampón a pH bajo (típicamente pH 2,5 a 4,0) inmediatamente neutralizado. Las dos fracciones se unirían o bien a células en un ensayo de unión FACS (o cualquier otro formato de unión estándar) o a ligando a concentraciones de proteína variables. Algunos de estos mAb se unirán de forma selectiva a la forma viva y se verá una diferencia entre la concentración necesaria para conseguir el 50% de la unión de la circulación frente a eluato. Este resultado marca a ese mAb como un mAb desmarcante. La relación de la proteína en el eluato a la circulación indicará el porcentaje de forma viva en el preparado.

Estos mAb así identificados pueden usarse para purificar por afinidad la forma viva. Además, su uso en varios formatos de inmunoensayo puede usarse para optimizar la expresión de la forma correcta de la forma de receptor Fc deseada. El ensayo puede usarse además en conjunto con otros métodos de purificación convencionales para encontrar métodos que purificarían la forma activa del receptor sin recurrir a técnicas de afinidad. Usando estos Abs para delinear las formas vivas y muertas, la temperatura de cultivo podría optimizarse y los métodos cromatográficos desarrollarse para enriquecer la forma viva. De forma alternativa, los métodos de columna HIC podrían explotarse para separar las formas viva y muerta y usando este método, las condiciones de cultivo podrían optimizarse. Asimismo, estos ensayos formarían la base para mutagénesis de cisteína de la parte de receptor para definir el problema de enlaces disulfuro que al eliminarse darían material funcionalmente activo.

Como muchos de estos receptores tendrán aplicación como agentes terapéuticos en enfermedad humana y se querrá poner solo formas plegadas de forma apropiada en un paciente, estos métodos tendrán utilidad tanto para definir la preparación como para eliminar las formas de unión pobre.

Será evidente para los expertos en la técnica que varias modificaciones y variaciones pueden hacerse en los métodos de la presente invención. Así, se pretende que la presente invención cubra las modificaciones y variaciones de esta invención con tal que vengan en el alcance de las reivindicaciones anexadas.

Tabla I: Resumen de mAbs anti-LT-b-R

Citotoxicidad de HT29

Nombre de mAb	Tinción celular precipitada ^f	Grupo ^g de unión* al receptor de bloqueo ^a	mAb inmovilizado en plástico ^b	mAb soluble solo	mAb soluble con banda LTa1/b2	mAb receptor	
BDA8	+++	+++	++	+/-	--- ^c	superior	I
AGH1	+++		+++	+/-	---	superior	I
BCG6	+++	++	+++	+/-	+/-	ambos	II
BHA10	+++	+++	+/- ^e	+/-	+/-	nd	II
BKA11	+++	+/-	+++	-	+++ ^d	ambos	III
CDH10	+++		+++	+/-	+++	nd	III
CBE11	+++	nd	+++	+/-	-	ambos	IV

^aEl ensayo evaluó si el anticuerpo bloquea la unión del receptor soluble a IL-23 activado, nd = no hecho

^bPlato recubierto de Fc anti-ratón de cabra, mAb anti-receptor capturado, HT29s más IFNg.

^cBloquea

^dPotencia

^eVariable, alguna inhibición parcial en algunos ensayos, ninguno en otros.

^fLa forma de receptor precipitó usando mAb más sistema KappaLock.

^gLos grupos se definieron en la base de los datos en esta tabla más mapeo de epítipo hecho usando tecnología BIAcore.

Tabla II. Expresión de constructos LT β R-Ig en células CHO cultivadas a diferentes temperaturas de cultivo

Constructo	Temperatura de fermentación °C	Expresión mg/L ^a	% de componentes inactivos ^b
LT β R05	37	6	50
	32	12	17
	28	20	10
LT β R09	37	10	50
	32	-	-
	28	76	6

^aEl nivel de expresión se evaluó usando cromatografía de afinidad de Proteína A. ^bLa cantidad de componentes inactivos presentes en el preparado de LT β R-Ig se evaluó después de purificación de afinidad de Proteína A usando el método HIC analítico.

5 Tabla III. Suplementos de medios de crecimiento DME/HAM's F-12

Componente	Cantidad en 1L de medios de crecimiento ^a
Suero bovino fetal	100 ml
Glucosa	1,85 g
Bicarbonato de amonio	2,2 g
Estreptomicina	140 mg
Gentamicina	50 mg
Etanolamina (existencias 1M)	0,1 ml
Ácido lipoico	91,2 mg
Ácido linoleico	38,4 mg
Triyodo-L-tironina	0,2 mg
Ex -Cyte VLE (Bayer)	1 ml
Insulina bovina	10 mg
Transferrina bovina	10 mg
Albúmina de suero bovino	50 mg
Plurónico F-68	1 g
Cisteína	82 mg
Metionina	34 mg
Serina	52 mg
Vaina	105,6 mg
Glicina	50 mg
Ácido aspártico	24,4 mg
Prolina	52,2 mg

^aLos componentes se mezclan con el polvo de medios base y el volumen se lleva entonces a 1L. El pH de los medios se ajusta a 7,20 ñ 7,25 usando HCl al 50%.

Referencias

- Aggarwal, B. y Natarajan, K. (1996) *Eur. Cytokine Rev.* 7:93
- Alderson, M. R. et al. (1994) *Eur J Immunol* **24**, 2219-27
- Ashkenazi, A. et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10535-9
- 5 Banner, D.W. et al (1993) *Cell* **73**, 431-445
- Baum, P.R. et al. (1994) *Embo J* **13**, 3992-4001
- Bazzoni, F. y Beutler, B. (1996) *New England J. Med.* 334:1717.
- Browning, J.L. et al. (1995) *J. Immunol.* **154**, 33-46
- Browning, J. et al (1996) *J. Exp. Med.* **183**; 867-878
- 10 Browning, J.L. et al. (1996a) *J. Biol. Chem.* **271**, 8618-8628
- Bucay, N. et al. (1998) *Genes and Development* 12:1260
- Chaplin, D. y F, Y-X. (1998) *Current Opinion in Immunology* **10**, 289-297
- Chiceportiche, Y. et al (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32401-32410
- Corcoran, A. et al (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 831-840
- 15 Crowe, P.D. et al. (1994) *Science* **264**, 707-10
- Eason, J.D. et al. (1996) *Transplantation* **61**:224
- Eggermont, A.M. et al. (1996) *J. Clin. Oncology* **14**:2653
- Fanslow, W.C. et al. (1992) *J Immunol* **149**, 655-60
- Feldmann, M. et al. (1997) *Ann. Immunol.* **64**:283-350
- 20 Goodwin, R.G. et al. (1993) *Cell* **73**, 447-56
- Green, D. y Ware, C.F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**:5986
- Harrop, J.A., et al, (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:27548
- Loetscher, H. et al. (1991) *J Biol Chem* **266**, 18324-9
- Mackay, F. et al. (1998) *Gastroenterology* **115**:1484-1475
- 25 Mackay, F y Browning, J. (1998) *Nature* **395**:26
- Mackay, F. et al. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 2033-42
- Marsters, S. et al (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5747-5750
- Mauri, D.N. et al. (1998) *Immunity* **8**, 21-30
- Mohler, et al. (1993) *J Immunol* **151**, 1548-61
- 30 Naismith, J. et al (1996) *J. Mol. Recognition* **9**, 113-117
- Rennert, P.D. et al (1996) *J Exp Med* **184**, 1999-2006
- Rennert, P.D., Browning, J.L. y Hochman, P.S. (1997) *Int Immunol* **9**, 1627-39
- Simmonet, W.S. et al. (1997) *Cell* **89**:309
- Smith, C.A., Farrah, T. y Goodwin, R.G. (1994) *Cell* **76**, 959-62
- 35 Smith, C.A. et al. (1993) *Cell* **73**, 1349-60
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. y Nagata, S. (1993) *Cell* **75**, 1169-78
- Van Dullemen, H.M. et al. (1995) *Gastroenterology* **109**:129

Ware, C.F. et al (1995) *Current topics in Microbiology and Immunology* **198**, 175-218

Además, la presente descripción se refiere a los siguientes puntos:

- 5 1. Un método para la expresión de altos rendimientos de fusiones de proteína Ig activas que comprende cultivar un huésped transformado con ADN que codifica una fusión de proteína Ig deseada en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 35°C.
2. El método del punto 2 en donde la temperatura es aproximadamente 27°C a aproximadamente 32°C.
3. El método del punto 3 en donde dicho huésped transformado se cultiva primero a una temperatura por encima de aproximadamente 33°C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el crecimiento de dicho huésped.
- 10 4. El método del punto 1 en donde dicha fusión de proteína Ig comprende un miembro de la familia del receptor de TNF.
5. El método del punto 3 en donde dicho miembro de la familia del receptor de TNF es un receptor de linfotóxina-β, TNFR-55, HVEM o un fragmento de los mismos.
6. El método del punto 1 que comprende además la etapa de recuperación de las fusiones de proteína Ig activas de dicho sistema de cultivo por cromatografía de interacción hidrófoba.
- 15 7. El método del punto 1 en donde dicho sistema de cultivo comprende células de insecto o bacterianas.
8. Una fusión de proteína Ig activa obtenida cultivando un huésped transformado con ADN que codifica la fusión en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 35°C.
9. La fusión del punto 8 que comprende un miembro de la familia de TNF.
10. La fusión del punto 9 que comprende receptor LT-β, o un fragmento del mismo.
- 20 11. La fusión del punto 9 que comprende HVEM, o un fragmento del mismo.
12. Un método para fabricar un preparado farmacéutico que comprende una fusión de proteína Ig activa comprendiendo dicho método:
 - 25 (a) cultivar un huésped transformado con ADN que codifica la fusión de proteína Ig en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 32°C, expresando así fusiones de proteína Ig activas;
 - (b) recuperar las fusiones de proteína Ig activas de dicho sistema de cultivo; y
 - (c) combinar las fusiones de proteína Ig activas de la etapa (b) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. El método del punto 12 en donde la fusión de proteína Ig comprende un miembro de la familia de TNF, o un fragmento del mismo.
- 30 14. El método del punto 13 en donde la fusión de proteína Ig comprende receptor de linfotóxina-β o un fragmento del mismo.
15. El método del punto 13 en donde la fusión de proteína Ig comprende HVEM, o un fragmento del mismo.
16. Un preparado farmacéutico obtenido
 - 35 (a) cultivando un huésped transformado con ADN que codifica la fusión de proteína Ig en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 32°C, expresando así fusiones de proteína Ig activas;
 - (b) recuperando las fusiones de proteína Ig activas de dicho sistema de cultivo; y
 - (c) combinando las fusiones de proteína Ig activas de la etapa (b) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 17. El preparado farmacéutico del punto 16 en donde la fusión de proteína Ig comprende un miembro de la familia de TNF.
18. El preparado farmacéutico del punto 17 en donde la fusión de proteína Ig comprende un receptor de linfotóxina-β o un fragmento del mismo.
19. El preparado farmacéutico del punto 17 en donde la fusión de proteína Ig comprende HVEM o un fragmento del mismo.

20. Un método para la expresión de altos rendimientos de fusiones de proteína Ig activas que comprende cultivar levadura transformada con ADN que codifica una fusión de proteína Ig deseada en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C.
21. El método del punto 20 en donde la temperatura es aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C.
- 5 22. El método del punto 20 en donde dicho huésped transformado se cultiva primero a una temperatura por encima de aproximadamente 30°C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el crecimiento de dicho huésped.
23. El método del punto 20 en donde dicha fusión de proteína Ig comprende un miembro de la familia de receptor de TNF.
- 10 24. El método del punto 23 en donde dicho miembro de la familia del receptor de TNF es un receptor de linfotoxina- β o un fragmento del mismo.
25. El método del punto 20 que comprende además la etapa de recuperación de fusiones de proteína Ig activas desde dicho sistema de cultivo por cromatografía de interacción hidrófoba.
26. Una fusión de proteína Ig activa obtenida cultivando levadura transformada con ADN que codifica la fusión en un sistema de cultivo que tiene una baja temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C.
- 15 27. La fusión del punto 26 que comprende un miembro de la familia de TNF.
28. La fusión del punto 27 que comprende receptor de LT- β o un fragmento del mismo.
29. La fusión del punto 26 que comprende HVEM o un fragmento del mismo.
30. Un preparado farmacéutico que comprende una fusión de proteína Ig activa que tiene un dominio Fc de Ig y unas cadenas peptídicas, en donde el dominio Fc de Ig está alterado alterando así la velocidad de formación de disulfuro en la región bisagra de dicha fusión de proteína Ig.
- 20 31. El preparado del punto 30, en donde dicho dominio Fc de Ig está alterado sustituyendo al menos un residuo de cisteína con alanina.
32. Una fusión de proteína Ig que comprende un dominio Fc de Ig reticulado a un péptido derivado de la familia de TNF en donde al menos un residuo de cisteína en el dominio Fc de Ig está sustituido con alanina.
- 25 33. La fusión de proteína Ig del punto 32 en donde dicho péptido está derivado de un receptor de linfotoxina- β .
34. Un método para fabricar una fusión de proteína Ig que comprende un dominio Fc de Ig reticulado a un péptido derivado de la familia del receptor de TNF por mutagenización de al menos un residuo de cisteína a una alanina, aumentando así el rendimiento de formas activas de fusión expresadas.
- 30 35. El método del punto 34 en donde dicho péptido es LTBR, y las cisteínas en las posiciones 101 y 108 están mutagenizadas a alaninas.
36. Una proteína de fusión LTBR-Ig que comprende alanina en las posiciones 101 y 108 del péptido LTBR.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la expresión de altos rendimientos de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y que minimiza la expresión de proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF inactivas, en donde las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas se unen al ligando con alta afinidad, que comprende cultivar una célula huésped de mamífero transformada con una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF deseada en un sistema de cultivo celular de mamífero que tiene una temperatura de 27°C a 32°C.
5
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además recuperar las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas del sistema de cultivo.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la temperatura es 27°C a 30°C.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la célula huésped de mamífero transformada se cultiva primero a una temperatura por encima de 33°C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el crecimiento de la célula huésped.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el miembro de la familia del receptor de TNF es un TNFR-55, TNFR-75, HVEM o una parte de unión al ligando de los mismos.
6. El método según la reivindicación 2, en donde los miembros de la familia del receptor de TNF activos se recuperan por cromatografía de interacción hidrófoba o están basados en su capacidad para unirse a un anticuerpo específico funcional.
7. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde el sistema de cultivo comprende células CHO.
- 20 8. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la región Ig es de un isotipo IgG 1.
9. Un método para obtener proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas y minimizar la expresión de proteínas de fusión de Ig inactivas, en donde las proteína de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas se unen al ligando con alta afinidad, que comprende cultivar una célula huésped de mamífero transformada con una molécula de ADN que codifica una proteína de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF deseada en medio de cultivo celular a una temperatura de 27°C a 32°C y aislar las proteínas de fusión del miembro Ig de la familia del receptor de TNF activas del medio de cultivo usando cromatografía de interacción hidrófoba.
25
10. El método según la reivindicación 9, en donde la temperatura es 27°C a 30°C.

Ilustración esquemática de proteínas quiméricas Fc de inmunoglobulina-receptor

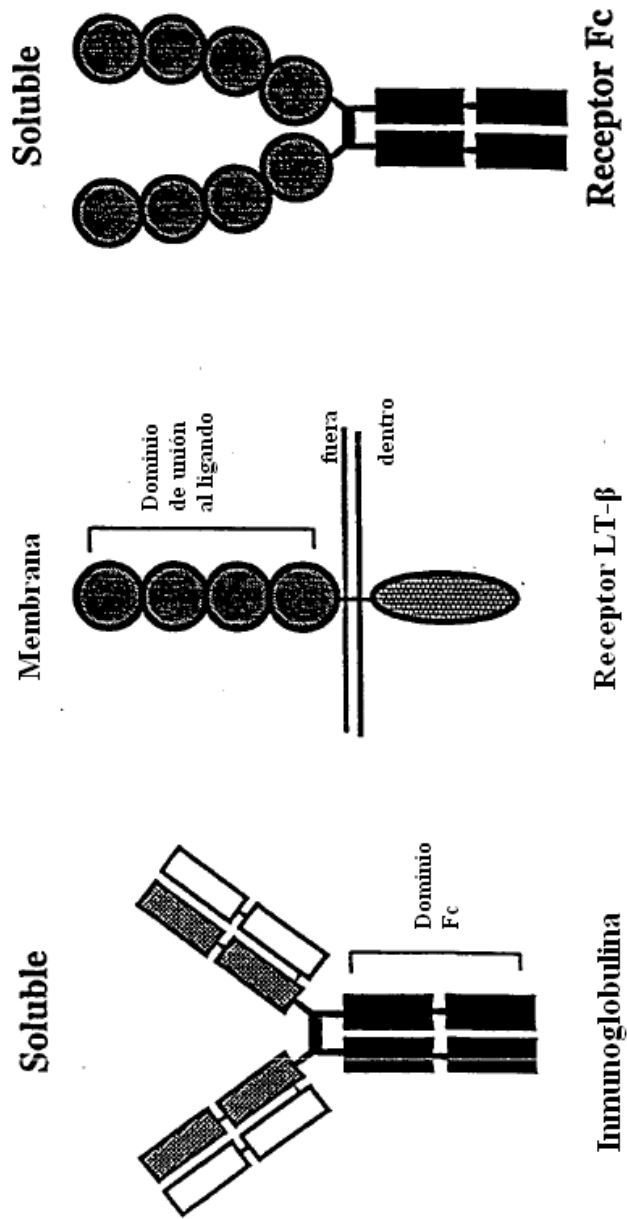


Figura 1

Posible naturaleza del problema "vivo/muerto" de la LT β R-Ig

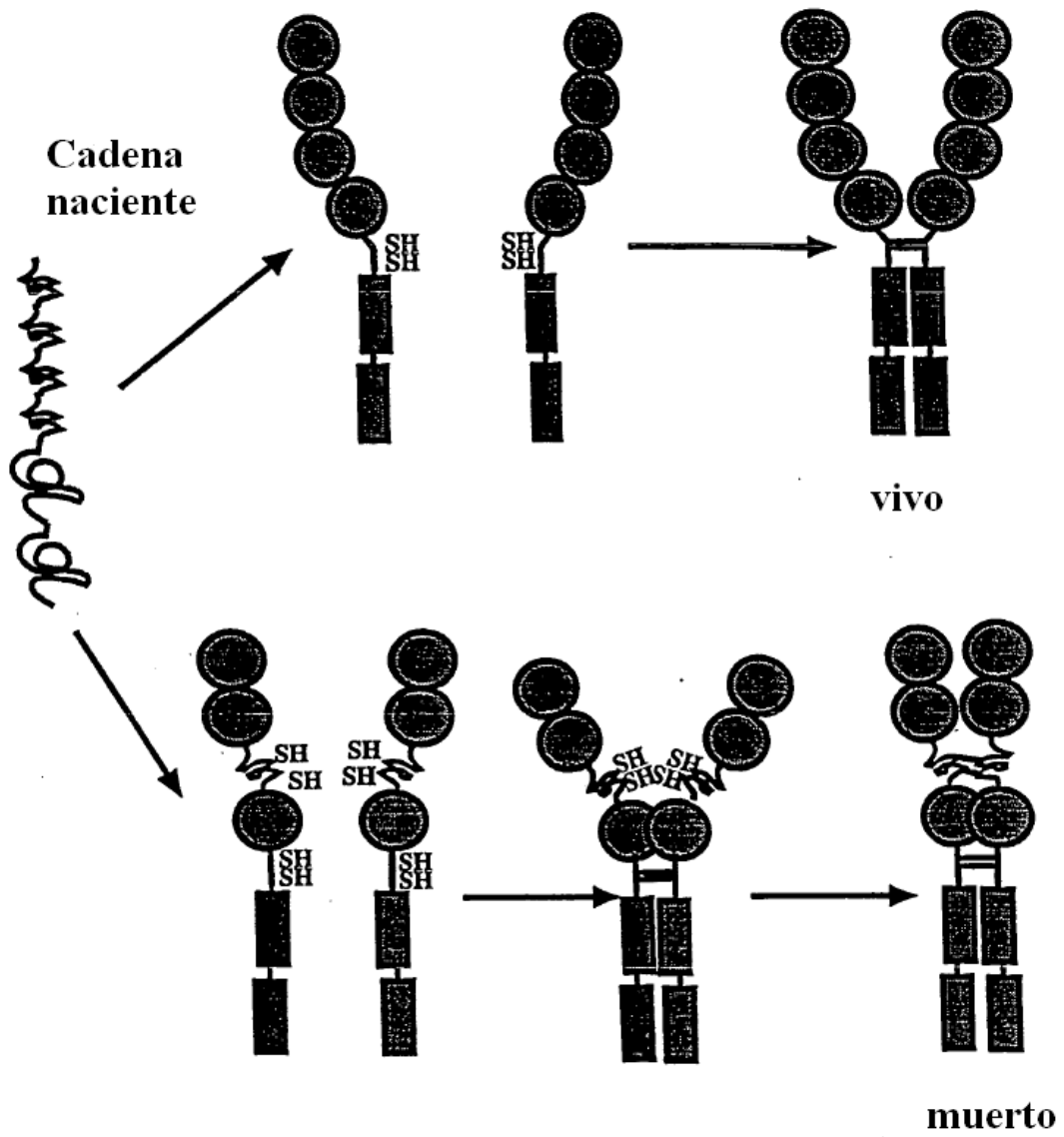


Figura 2

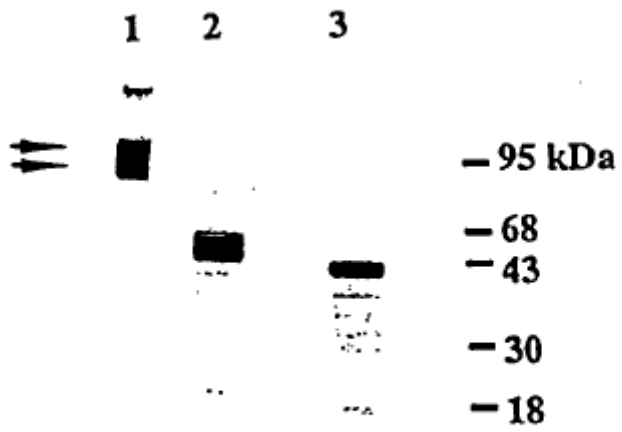


Figura 3

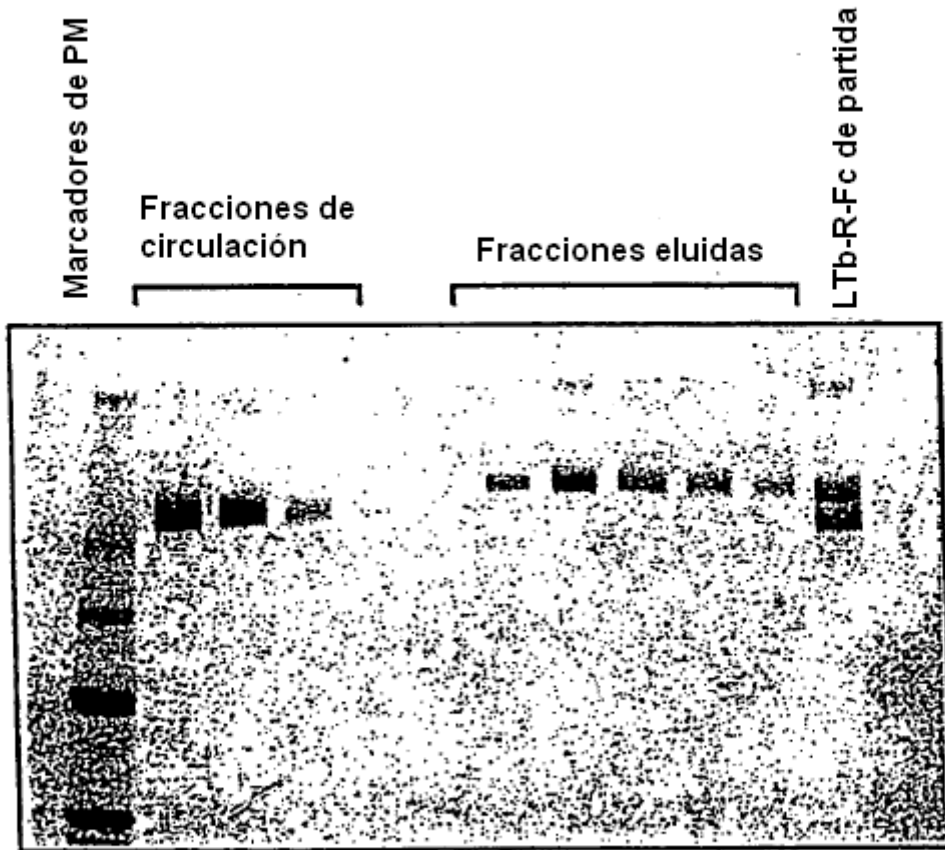


Figura 4

ANALISIS FACs DE BANDAS SUPERIOR E INFERIOR PURIFICADAS DE AG-H1-5 EN CELULAS II-23 ACTIVADAS CON PMA (50 ng/ml)

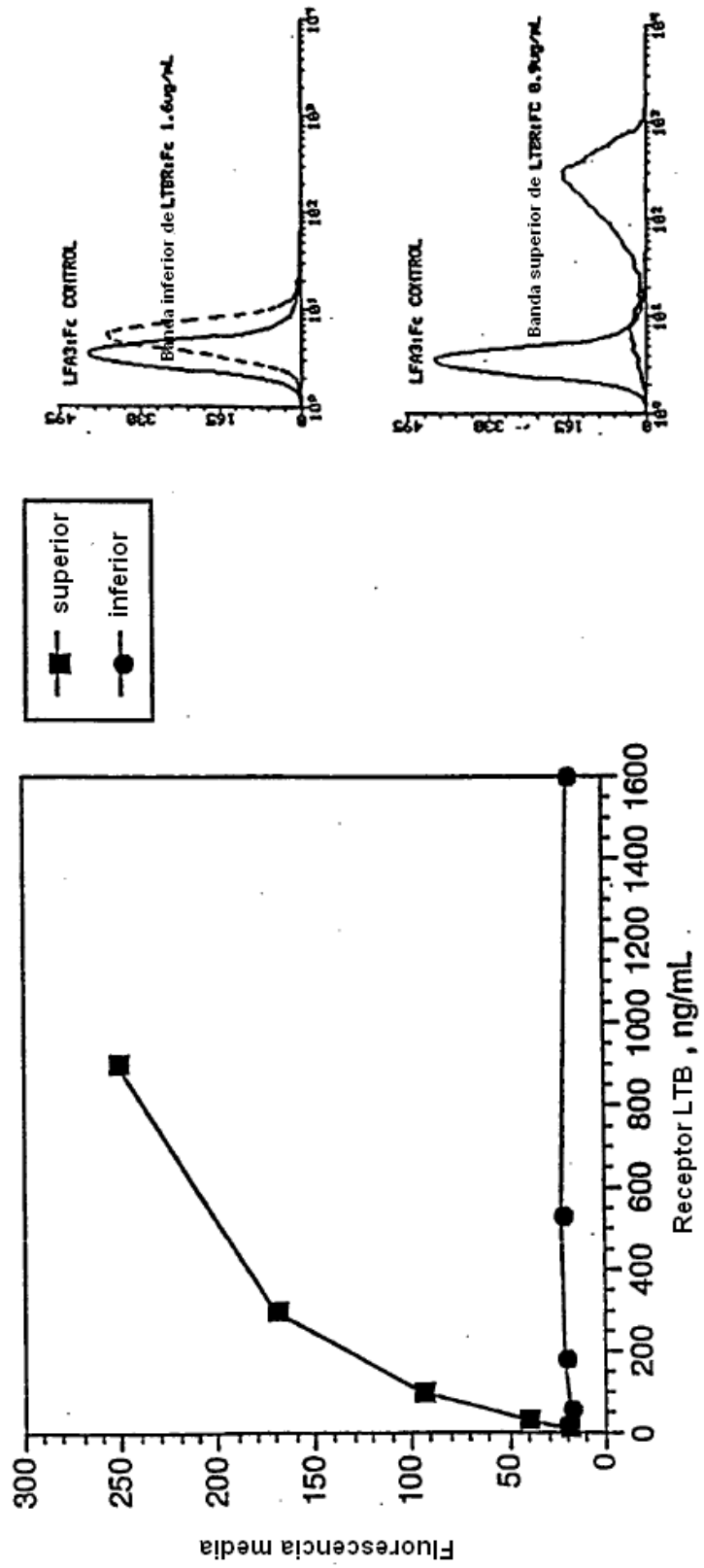
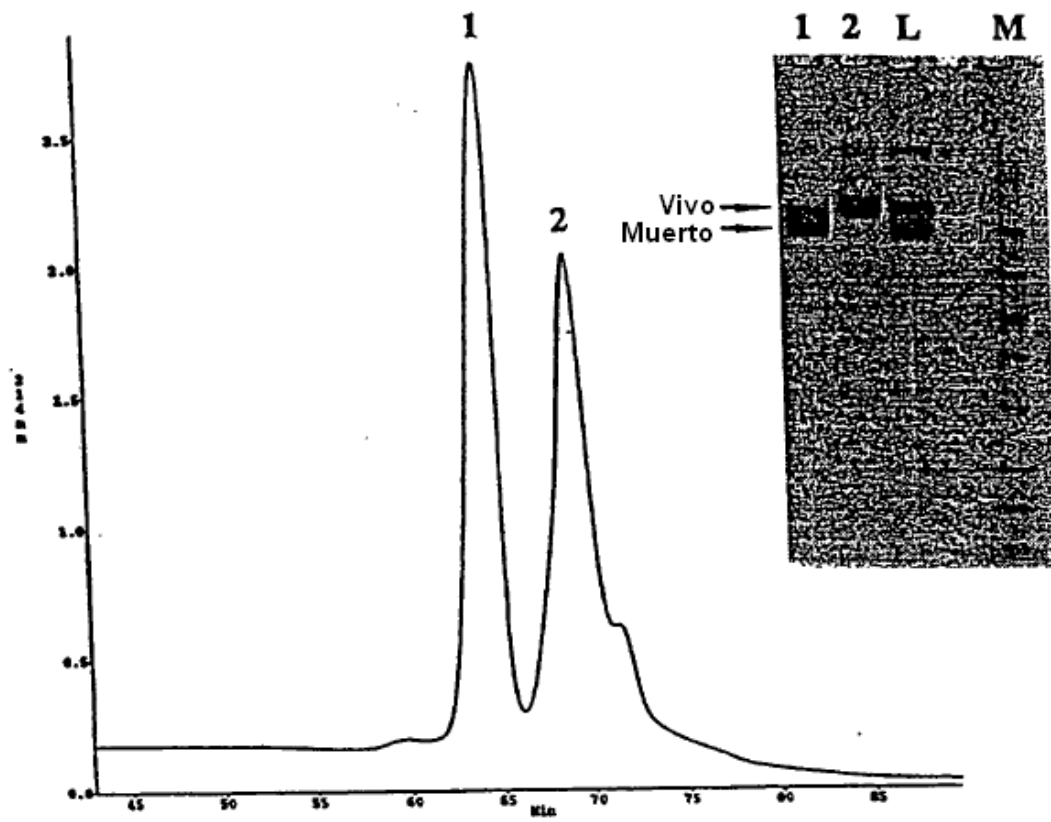


Figura 5



Fracciones de HIC analítica

Figura 6

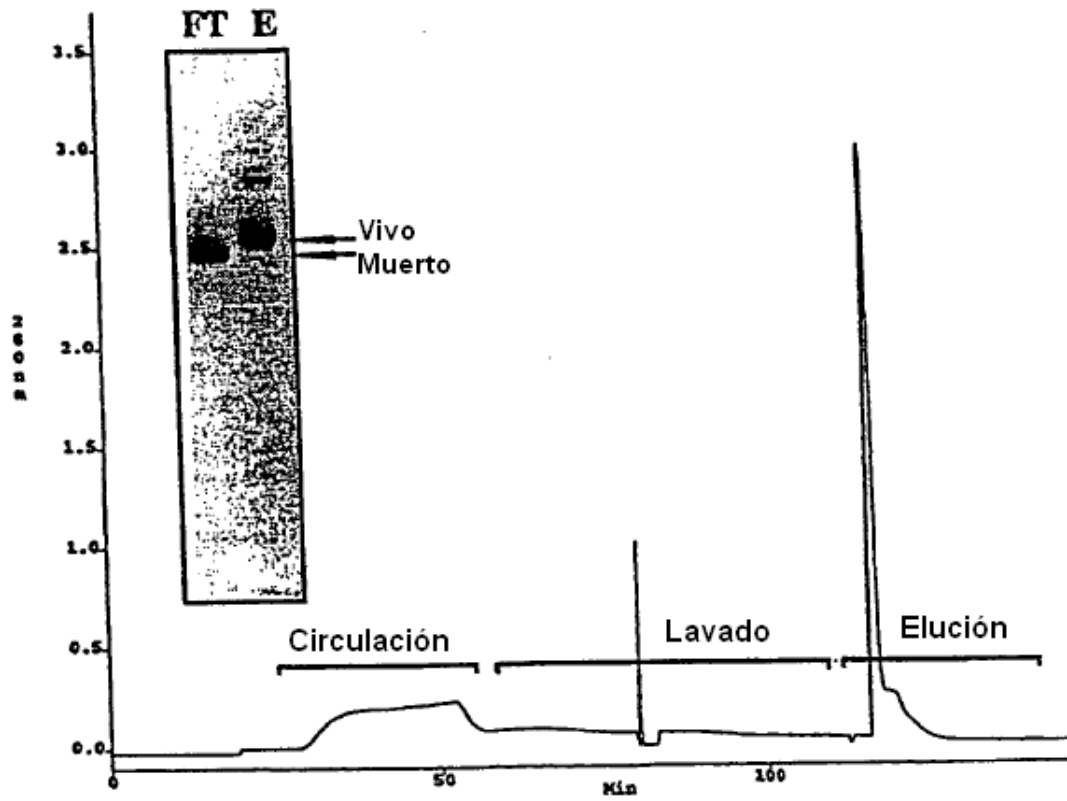


Figura 7

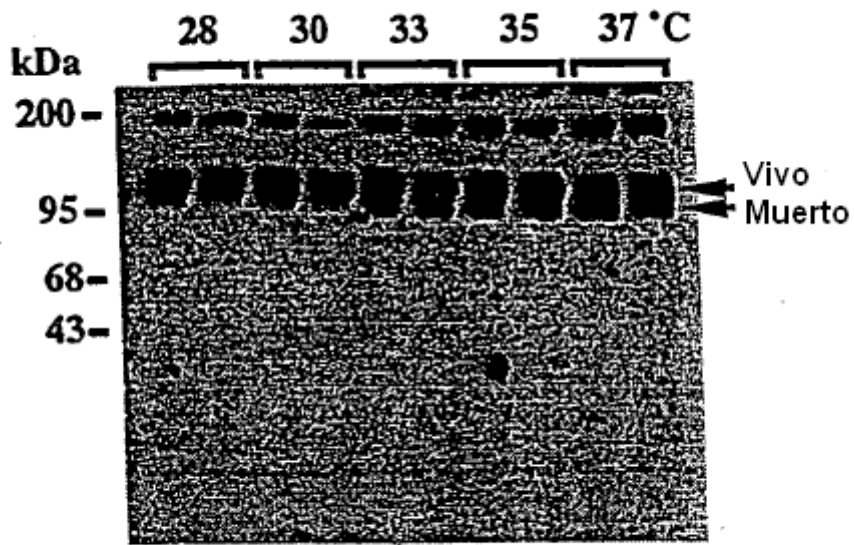


Figura 8

Efecto de la temperatura de incubación en el % de hLTBR muerto

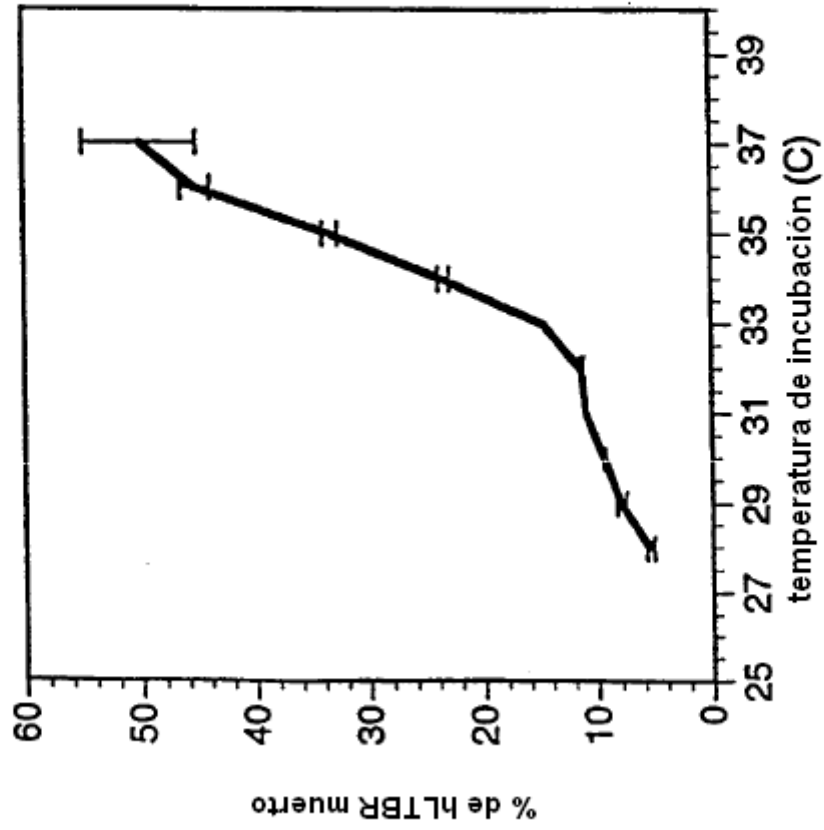


Figura 9

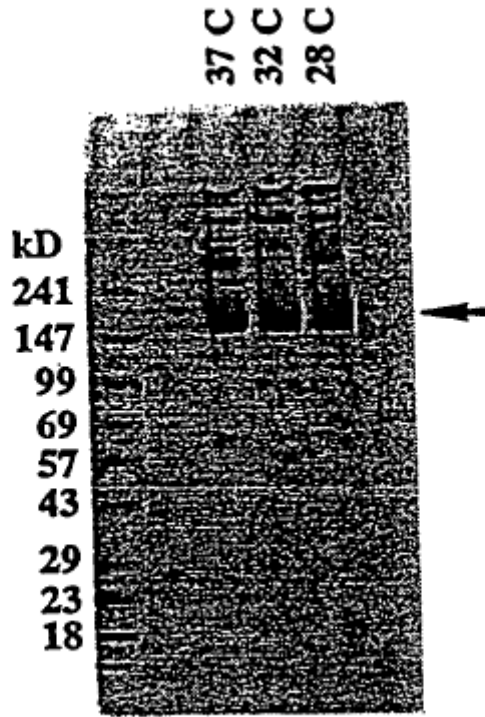
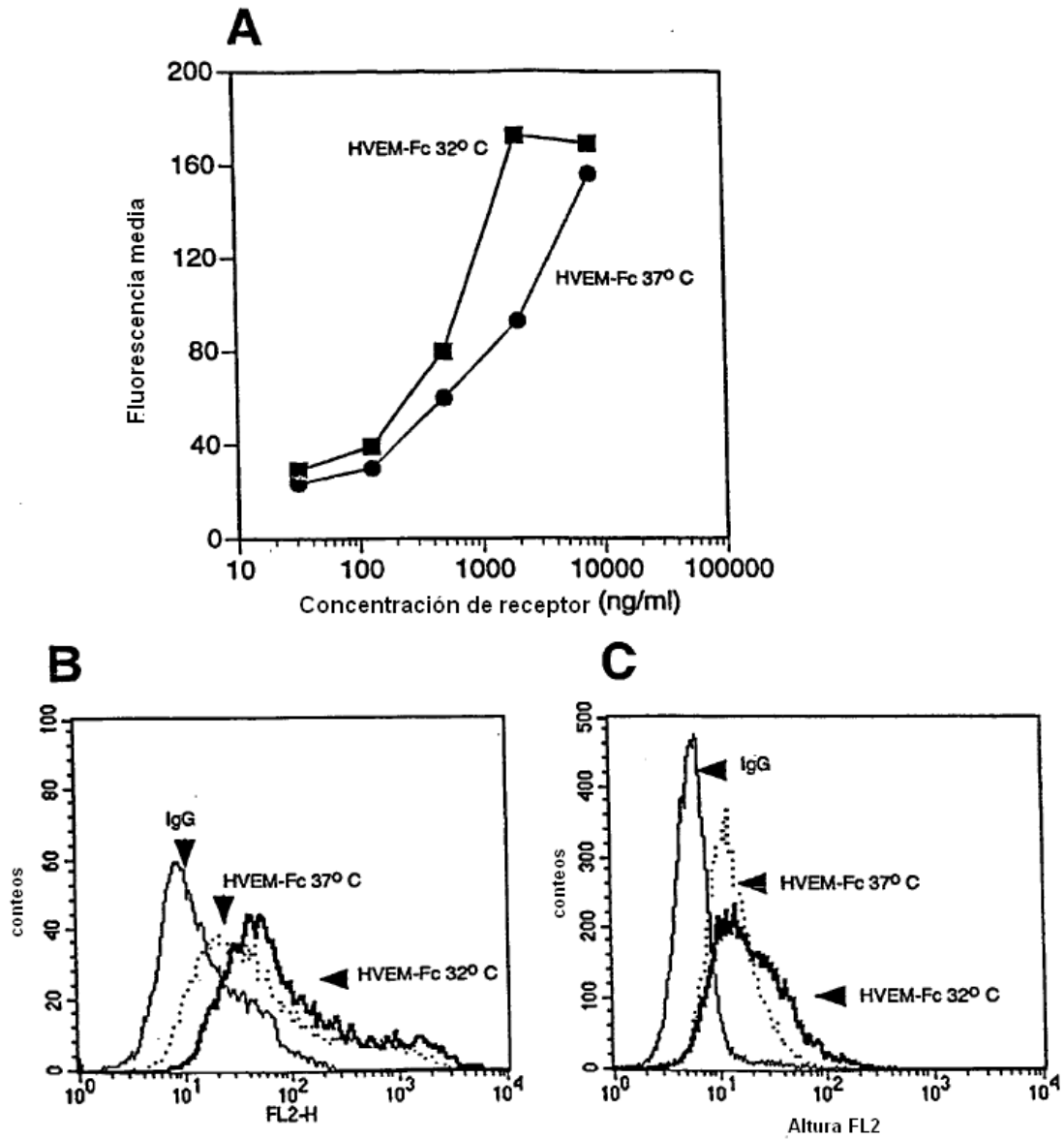


Figura 10



A. Unión de HVEM-Fc a células EBNA 293 transfectadas con LIGHT. Las células se eliminaron con EDTA 5 mM y se tiñeron con HVEM-Fc durante 30 min a 4°C, después se tiñeron con anti-hulgG-PE de burro.
 B. Unión de HVEM-Fc (2 ug/ml) a células EBNA 293 transfectadas con LIGHT.
 C. Unión de HVEM-Fc (10 ug/ml) a células de hibridoma T II-23 activadas durante 6 hr a 37°C con forboléster (50 ng/ml).

Figura 11

Análisis BIAcore: La unión de linfotoxina alfa o LIGHT humanos a HVEM-Ig

humano se produjo a las temperaturas indicadas y se inmovilizó en el chip a niveles iguales (RU). Las escalas del eje Y y X son idénticas en cada figura (-50 a 500 RU, 0 a 1200 segundos)

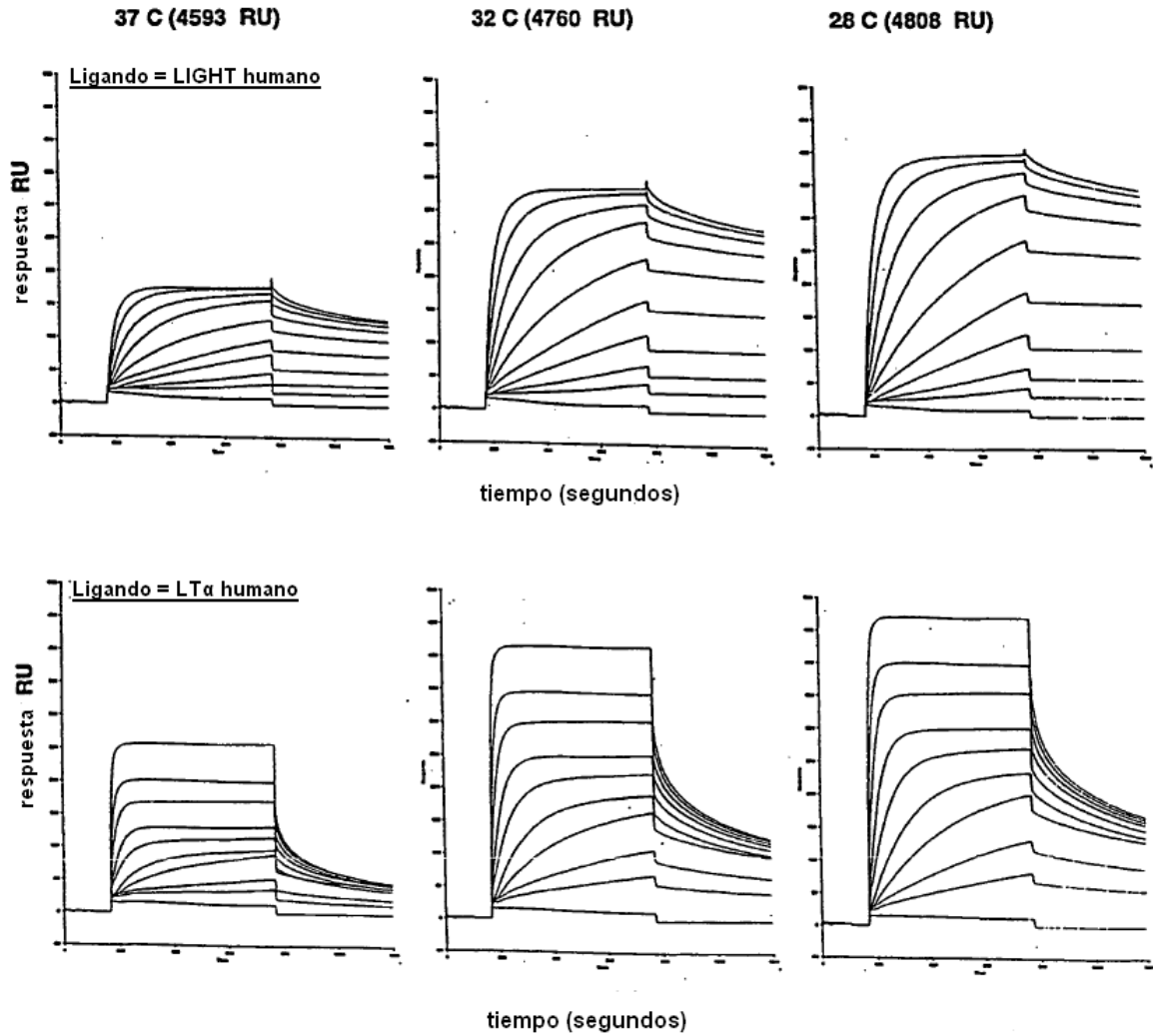


Figura 12