

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 896**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/31** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2011 E 15181524 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2977088**

54 Título: **Polipéptido de unión a la región Fc de la inmunoglobulina G**

30 Prioridad:

**08.03.2010 EP 10155835**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.11.2017**

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE BIOPROCESS R&D AB  
(100.0%)  
Björkgatan 30  
751 84 Uppsala , SE**

72 Inventor/es:

**ABRAHMSSEN, LARS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 641 896 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

Polipéptido de unión a la región Fc de la inmunoglobulina G

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un polipéptido de unión a la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG Fc) y a métodos para su producción. El polipéptido tiene aplicación industrial, por ejemplo, en la separación y/o purificación para la producción de anticuerpos y/o proteínas de fusión con Fc, por ejemplo en cromatografía.

**Antecedentes**

10 En la producción industrial de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión con Fc, la purificación se realiza frecuentemente usando cromatografía. La proteína A de *Staphylococcus aureus* se ha utilizado durante mucho tiempo como ligando de afinidad en dichas aplicaciones, debido a la afinidad natural de la proteína A por la porción Fc de IgG. La proteína A en su totalidad, así como sus cinco dominios individuales de unión a Fc, han servido posteriormente como puntos de partida para el diseño racional de ligandos de afinidad modificados con propiedades mejoradas.

15 Por ejemplo, el dominio B de la proteína A sirvió como punto de partida para la creación de la proteína Z de un solo dominio, unida a IgG Fc, modificada (Nilsson B *et al.*, Protein Eng 1 (2):107-13, 1987). Con el fin de mejorar la estabilidad de esta proteína en condiciones alcalinas, tales como las empleadas en los procedimientos de limpieza *in situ* durante procesos cromatográficos industriales, Linholt *et al.* (Proteins 55(2):407-16, 2004) propusieron una variante de proteína Z que comprende residuos de asparagina mutados. Esta variante fue desarrollada posteriormente por GE Healthcare, Uppsala, Suecia, en el producto comercial MAbSelect™ SuRe. En el documento WO2009/146755 se describen variantes de Z adicionales con afinidad por IgG Fc.

20 Las proteínas de unión mutadas basadas en la proteína Z, en las que ha sido modificada la unión a IgG Fc natural, están descritas en los documentos WO2009/080811 y US 5.143.844A. Los polipéptidos de unión a la región Fc de IgG que se pueden producir por escisión de multímeros están descritos en SAITO A *et al.*, (Protein Engineering 2(6):481-488, 1989).

25 Se ha demostrado que la proteína A natural, con sus cinco dominios individuales de unión a IgG Fc, se une a sólo 2 moléculas de IgG, o a 3 moléculas del fragmento Fc recombinante, a pesar de que cada uno de los cinco dominios tiene la capacidad de unirse a una IgG (Birger Jansson, PhD Thesis, Estocolmo, Suecia, 1996, ISBN 91-7170-656-9).

30 A pesar del éxito comparable de los ligandos de afinidad por IgG Fc utilizados actualmente, existe una necesidad continuada de mejora, especialmente con respecto a los requisitos combinados de mejorar la estequiometría y al mismo tiempo mantener, e idealmente mejorar, la estabilidad en condiciones ácidas y alcalinas. La provisión continuada de agentes con afinidad por IgG Fc sigue siendo un asunto de interés sustancial.

**Sumario de la invención**

35 De acuerdo con uno de sus primeros aspectos, la invención proporciona un polipéptido de unión a la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG Fc), que comprende la secuencia de aminoácidos:

i)  $X_1$ -([espaciador1]-KFDKEQQN AFYEILX<sub>17</sub>LPX<sub>20</sub> LTEEQRNAFI  
 QKLKDX<sub>36</sub>PSQS AELLAEAKQL X<sub>51</sub>EAQA-[espaciador2])<sub>n</sub>-C<sub>CTERM-1</sub>X<sub>CTERM</sub>

en donde, independientemente uno de otro,

X<sub>1</sub> es P;

40 [espaciador1] es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1-3 residuos de aminoácidos;

X<sub>17</sub> es cualquier residuo de aminoácidos;

X<sub>20</sub> es cualquier residuo de aminoácidos;

X<sub>36</sub> es E o A;

X<sub>51</sub> es cualquier residuo de aminoácidos;

45 [espaciador2] es una secuencia de aminoácidos que consiste en 0-20 residuos de aminoácidos;

X<sub>CTERM</sub> es D; y

n es 1-4.

En una realización de este aspecto de la invención, el polipéptido de unión a la región Fc de inmunoglobulina G (IgG Fc) consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de i) como se ha definido anteriormente.

5 La secuencia de aminoácidos del polipéptido de acuerdo con la invención ha sido concebida por el presente inventor con el fin de proporcionar una molécula optimizada de unión a IgG Fc, tomando como punto de partida los diversos dominios de la proteína A de *Staphylococcus*, así como la proteína Z derivada del dominio B de la proteína A. Al igual que la estructura del dominio modular de la proteína A natural o sus variantes modificadas previamente conocidas, el polipéptido de la presente invención proporciona uno o más dominios distintos que poseen capacidad de unión a IgG Fc. En particular, se predice que la secuencia de aminoácidos entre las dos secuencias espaciadoras se pliega en un solo dominio en haz de tres hélices con capacidad de unión a IgG Fc. Como se ha descrito anteriormente, el número n puede estar entre 1 y 4, lo que significa que un polipéptido de acuerdo con la invención puede tener de uno a cuatro dominios distintos de unión a IgG Fc separados por las secuencias espaciadoras, formando un monómero, dímero, trímero o tetrámero de dichos dominios.

15 En la proteína Z, la posición del aminoácido correspondiente a la posición 17 en la secuencia de aminoácidos i) anterior está ocupada por un residuo de histidina. En el polipéptido de la invención, X<sub>17</sub> puede ser H, pero también puede estar sustituido por cualquier otro residuo de aminoácido. La sustitución en esta posición puede estar motivada por la necesidad general de evitar aminoácidos químicamente reactivos.

20 En la proteína Z, la posición del aminoácido correspondiente a la posición 36 en la secuencia de aminoácidos i) anterior está ocupada por un residuo de ácido aspártico. En la secuencia de aminoácidos i), sin embargo, esta posición está sustituida, por ejemplo, por un residuo de ácido glutámico o un residuo de alanina. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría, actualmente se cree que esta diferencia sirve para los dos fines separados de a) aumentar la estabilidad en ácidos del polipéptido y b) eliminar un dipéptido DP dentro del dominio del haz de tres hélices, que de otro modo sería susceptible de escisión catalizada por ácido. Un aspecto de la invención, descrito con más detalle a continuación, utiliza la susceptibilidad del resto de dipéptido DP en otra parte de la molécula y la presencia de un dipéptido DP en las posiciones 36-37 disminuiría la viabilidad de este aspecto de la invención.

25 En la proteína Z, la posición del aminoácido correspondiente a la posición 49 en la secuencia de aminoácidos i) anterior está ocupada por un residuo de lisina. En la secuencia de aminoácidos i), sin embargo, esta posición está ocupada por un residuo de glutamina.

30 Como apreciarán los expertos en la técnica, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión a IgG Fc de los polipéptidos de acuerdo con la invención, depende de la estructura terciaria del polipéptido. Es posible hacer cambios en la secuencia de aminoácidos en un polipéptido  $\alpha$ -helicoidal sin afectar su función (Taverna and Goldstein, J. Mol Biol 315(3):479-84, 2002; He *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 105(38):14412-17, 2008). Por tanto, la descripción abarca variantes modificadas de i), que son tales que la secuencia resultante sea al menos 95% idéntica a una secuencia perteneciente a la clase definida por i). Por ejemplo, es posible que un residuo de aminoácido perteneciente a un cierto grupo funcional de residuos de aminoácidos (por ejemplo, hidrófobo, hidrófilo, polar, etc.) pueda ser intercambiado por otro residuo de aminoácido del mismo grupo funcional.

35 Cuando en la presente memoria se hace referencia al grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos de diferentes polipéptidos, se considera el límite inferior del 95% de identidad con una secuencia descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención puede tener una secuencia que sea al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia descrita en la presente memoria. El término "% de identidad", como se utiliza en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, puede calcularse, por ejemplo, como sigue. La secuencia buscada se alinea con la secuencia diana usando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Se realiza una comparación sobre la ventana correspondiente a la secuencia más corta de las alineadas. La secuencia más corta de las alineadas puede en algunos casos ser la secuencia diana, tal como el resto de unión HER3 de 29 residuos de aminoácidos. En otros casos, la secuencia buscada puede constituir la secuencia más corta de las alineadas. La secuencia buscada puede consistir, por ejemplo, en al menos 10 residuos de aminoácidos, tales como al menos 20 residuos de aminoácidos. Se comparan los residuos de aminoácidos en cada posición y el porcentaje de posiciones en la secuencia buscada que tienen correspondencias idénticas con la secuencia diana se expresa en % de identidad.

40 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, [espaciador1] se selecciona entre A, AE y AEA. [espaciador1] puede ser por ejemplo A.

En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X<sub>17</sub> es H.

45 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X<sub>20</sub> es cualquier residuo de aminoácido excepto N. X<sub>20</sub> puede ser por ejemplo T.

En una realización alternativa, X<sub>20</sub> es N.

En el polipéptido de acuerdo con la invención,  $X_{36}$  se selecciona entre E y A.  $X_{36}$  puede ser, por ejemplo, E.

En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención,  $X_{51}$  es cualquier residuo de aminoácido excepto N.  $X_{51}$  puede ser por ejemplo D.

En una realización alternativa,  $X_{51}$  es N.

- 5 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, todos los residuos de aminoácidos del [espaciador2] se seleccionan independientemente de A, E, F, G, I, K, L, P, Q, R, S, T y V, en particular de A, E, G, K, P, Q, R, S y T, tal como de G, Q y S. En una realización aún más específica, el [espaciador2] es G.

Como se ha expuesto anteriormente,  $n$  es un número entre 1 y 4, es decir, puede ser 1, 2, 3 ó 4.

- 10 En los polipéptidos de acuerdo con la invención en donde  $n > 1$ , los múltiples casos del [espaciador1] pueden consistir cada uno individualmente en la misma secuencia de aminoácidos o ser diferentes secuencias de aminoácidos. Igualmente, en polipéptidos de acuerdo con la invención en donde  $n > 1$ , los múltiples casos del [espaciador2] pueden consistir cada uno individualmente en la misma secuencia de aminoácidos o ser diferentes secuencias de aminoácidos.

- 15 Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquier aspecto de la invención puede unirse a IgG Fc de tal manera que el valor de  $K_D$  de la interacción sea como máximo  $1 \times 10^{-6}$  M, por ejemplo como máximo  $1 \times 10^{-7}$  M, tal como máximo  $5 \times 10^{-8}$  M.

- 20 El polipéptido es ventajoso porque se une bien a una IgG Fc. En particular, el polipéptido puede ser capaz de unirse a la porción Fc de una molécula de IgG humana. En algunas realizaciones de la invención, el polipéptido es capaz de unirse a las clases 1, 2 y 4 de IgG humana, pero no a la clase 3. En algunas realizaciones, el polipéptido es capaz de unirse a la interfaz entre los dominios CH2 y CH3 de la IgG Fc.

En una realización del polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención,  $X_1$  es P.

En una realización del polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención,  $X_{CTERM}$  es D.

En una realización particular del polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención,  $X_1$  es P y  $X_{CTERM}$  es D.

- 25 En una realización del polipéptido de acuerdo con la descripción, la secuencia de aminoácidos i) se selecciona de SEQ ID NO:1-6 de la Figura 1 adjunta. Puede ser, por ejemplo, la SEQ ID NO:1. Como es fácilmente evidente,  $n = 1$  para las secuencias SEQ ID NO:1-2 y  $n = 2$  para las secuencias SEQ ID NO:3-6. También es evidente a partir de las secuencias apropiadamente dichas que las SEQ ID NO:1-4 son ejemplos de la realización en donde  $X_1$  es P y  $X_{CTERM}$  es D, mientras que las SEQ ID NO:5-6 son ejemplos de otra realización.

- 30 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

- 35 Como se ha explicado anteriormente, en el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención,  $X_1$  es P y  $X_{CTERM}$  es D en su secuencia de aminoácidos. Este diseño de los residuos de aminoácidos N- y C-terminales permite un método conveniente para la producción del polipéptido de unión a IgG Fc por tecnología de DNA recombinante, produciendo en primer lugar un multímero que tiene copias del polipéptido de la invención como subunidades, estando separada cada subunidad de las otras por medio del dipéptido DP. La secuencia de aminoácidos DP es susceptible de hidrólisis catalizada por ácido, de modo que el sitio del dipéptido entre las subunidades se puede usar como un sitio de escisión para la separación unas de otras de las subunidades en el multímero. Como ejemplos no limitativos, el multímero puede comprender 2-6 subunidades, tales como 4 subunidades o 6 subunidades. A este respecto, se señala que las subunidades que forman el multímero pueden comprender ellas mismas de 1 a 4 dominios distintos de unión a IgG Fc, como se ha descrito anteriormente respecto al número  $n$  en la secuencia de i). Las subunidades separadas por secuencias DP y los dominios individuales de unión a IgG Fc pueden constituir los mismos elementos estructurales en el multímero (es decir, si  $n = 1$ ), pero también pueden constituir elementos estructurales diferentes de los elementos de la construcción (si  $n = 2-4$ ).

- 45 Por tanto, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido multímero que comprende:

- al menos dos subunidades, siendo cada subunidad un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto, en donde  $X_1$  es P y  $X_{CTERM}$  es D; y
- un péptido guía N-terminal que comprende un residuo D como el último de sus residuos.

- 50 Por tanto, con el fin de proporcionar un dipéptido DP adecuado para la escisión, el péptido guía N-terminal tiene que comprender un residuo D como el último de sus residuos. En el polipéptido multímero, este residuo D forma un dipéptido DP junto con el residuo  $P_1$  de la primera subunidad. La secuencia exacta del resto del péptido guía N-

terminal no es crítica para la invención, siempre y cuando cualquier residuo de aminoácido que preceda al residuo D no interfiera con la escisión del dipéptido DP. El principio del péptido guía dependerá del sistema de expresión utilizado para la producción. Por ejemplo, se puede usar la expresión intracelular para producir un péptido guía de MD a partir del cual se separa luego el M *in vivo*, a partir de una proteína soluble. Si la expresión se dirige hacia la formación de cuerpos de inclusión, se puede usar un péptido guía de MXGD, en el que X puede ser cualquier aminoácido o G o estar excluido.

La descripción proporciona también un polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido multímero, como se ha descrito inmediatamente antes.

La presente descripción proporciona, incluso en un aspecto relacionado, un método para producir un polipéptido multímero como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho método:

- proporcionar una célula hospedante que aloja un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un multímero, como se ha descrito anteriormente,
- cultivar la célula hospedante en condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido en un polipéptido multímero, y
- aislar el polipéptido multímero resultante.

Una vez que ha sido aislado el polipéptido multímero resultante, puede ser utilizado como material de partida para la producción de los polipéptidos de unión a IgG Fc del primer aspecto de la invención, puesto que estos polipéptidos están presentes como las subunidades del multímero. De este modo, la descripción proporciona también un método para producir un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto, comprendiendo dicho método:

- producir un polipéptido multímero usando el método descrito inmediatamente antes,
- escindir el polipéptido multímero en sitios que comprendan la secuencia DP usando hidrólisis catalizada por ácidos, produciendo polipéptidos de unión a IgG Fc de acuerdo con el primer aspecto de la invención y el péptido guía N-terminal, y
- aislar dichos polipéptidos de unión a IgG Fc.

Tanto si comprenden como si no secuencias DP y tanto si se preparan o no de acuerdo con el procedimiento conveniente descrito en el apartado anterior, cualquier polipéptido de acuerdo con la descripción comprende un residuo de cisteína en la penúltima posición  $C_{CTERM-1}$  (que es de hecho la última posición si  $X_{CTERM}$  no está presente). La incorporación de este residuo de cisteína a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención permite un acoplamiento químico altamente versátil del polipéptido a otros compuestos. El uso de este residuo de cisteína para acoplar el polipéptido, directa o indirectamente, a una matriz, permite la producción de un medio de separación útil para la separación a escala industrial de moléculas que contienen IgG Fc, por ejemplo en un procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales. El ligando de afinidad en el medio de separación o medio de cromatografía es el polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con el primer aspecto de la invención. La matriz puede estar hecha de un material orgánico o inorgánico. En una realización, la matriz se prepara a partir de un polímero natural, tal como material de carbohidrato reticulado, por ejemplo agarosa, agar-agar, celulosa, dextrano, quitosano, konjac, carragenano, goma gellan, alginato, etc. Las matrices de polímero naturales se preparan fácilmente y opcionalmente se reticulan de acuerdo con métodos estándares, tales como gelificación en suspensión inversa (S Hjertén (1964), *Biochim Biophys Acta* 79(2):393-398). En una realización alternativa, la matriz se prepara a partir de un polímero o copolímero sintético, tal como polímeros sintéticos reticulados, por ejemplo estireno o derivados de estireno, divinilbenceno, acrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ésteres de vinilo, vinil-amidas, etc. Dichas matrices de polímeros sintéticos se preparan fácilmente y se reticulan opcionalmente según métodos estándares. Como ejemplos no limitativos de acoplamiento directo a una matriz, el polipéptido de unión a IgG Fc se puede unir por medio de  $C_{CTERM-1}$  a una maleimida-agarosa, yodoacetil-sefarosa o agarosa, por ejemplo SulfoLink® de Pierce. Como ejemplo no limitativo de acoplamiento indirecto, el polipéptido de unión a IgG Fc se puede unir por medio de  $C_{CTERM-1}$  a un polímero enlazador, formando una composición intermedia de unión a IgG Fc. Esta composición intermedia se puede unir a su vez a una matriz por medio de grupos reactivos, bien al polipéptido de unión a IgG Fc o al polímero enlazador.

Los polímeros enlazadores preferidos son estables, tanto frente a la hidrólisis catalizada por ácido como por base, así como frente a la degradación proteolítica. Son hidrófilos y de origen no ácido nucleico y no peptídico. Desde un punto de vista regulador, los polímeros preferidos son los que se han utilizado previamente *in vivo*, pero la invención no está limitada a ellos. Un polímero enlazador particularmente preferido es poli(etilenglicol), PEG. La longitud del polímero enlazador entre los polipéptidos de unión a IgG Fc acoplados debería ser suficiente para permitir una estequiometría 1:1 de la interacción entre moléculas que contienen IgG Fc y cada dominio de unión a Fc.

En la composición de unión a IgG Fc de la invención, la estabilidad frente a la hidrólisis catalizada por ácido o base se asegura uniendo los dominios plegados usando un polímero enlazador químicamente estable.

Por tanto, en otro de sus aspectos, la invención proporciona una composición de unión a IgG Fc, que comprende al menos un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con el primer aspecto, acoplado covalentemente a un polímero enlazador no ácido nucleico y no péptido por medio del residuo de cisteína  $C_{CTERM-1}$ .

En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para producir dicha composición de unión a IgG Fc. El método comprende:

- proporcionar al menos un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con el primer aspecto, y
- acoplar dicho polipéptido a un polímero enlazador no ácido nucleico y no péptido por medio del residuo de cisteína  $C_{CTERM-1}$  presente en dicho polipéptido.

El número de polipéptidos de unión a IgG Fc acoplados a cada molécula del enlazador polimérico se puede determinar por diseño, por ejemplo utilizando una mezcla predeterminada de moléculas de polímero adaptadas para la conjugación con diferentes números de polipéptidos de unión a IgG Fc. Por ejemplo, se puede usar un polímero que tenga 1-4 sitios de conjugación para los polipéptidos de unión a IgG Fc en la preparación de una composición homogénea de unión a IgG Fc, o se puede usar una mezcla de polímeros que tengan 1-4 sitios de conjugación para preparar la correspondiente composición de unión a Fc.

En el caso en el que el polipéptido de unión a IgG Fc comprenda los residuos de aminoácidos  $P_1$  y  $D_{CTERM}$ , la primera etapa de este método de producción se puede realizar de acuerdo con la descripción anterior de un método para producir dichos polipéptidos como subunidades en un multímero, cuyas subunidades están separadas por secuencias DP susceptibles de escisión por hidrólisis catalizada por ácido. En otras palabras, en esta realización de la invención, se puede preparar una composición para uso como ligando de afinidad en un medio de cromatografía por: i) expresando un multímero que comprende los polipéptidos individuales de unión a IgG Fc (tanto mono-, di-, tri- o tetra-méricos) como subunidades, ii) escindiendo el multímero en sus subunidades constituyentes por hidrólisis catalizada por ácido, y iii) acoplando las subunidades resultantes (es decir, los polipéptidos de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención) al polímero enlazador por medio del residuo  $C_{CTERM-1}$ .

En algunas realizaciones de la composición de la invención y de los métodos para producirla descritas anteriormente, el polímero enlazador es poli(etilenglicol).

La composición de acuerdo con la invención puede ser conectable adecuadamente a una matriz o medio de cromatografía por medio del polímero enlazador. La naturaleza química del grupo utilizado para la unión de la composición a la matriz es preferiblemente diferente de la del grupo utilizado para la conjugación de los polipéptidos de unión a IgG Fc con el polímero enlazador. Gracias a la estabilidad de los polipéptidos de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención respecto a las condiciones tanto ácidas como básicas, la activación de un grupo de reacción puede ser realizada bien por una base o por un ácido. La longitud del polímero entre la matriz y el polipéptido de unión a IgG Fc más próximo no debe interferir con las propiedades de unión a IgG de este dominio. La elección entre los compuestos químicos de acoplamiento disponibles y su adaptación a la presente invención está dentro de las capacidades del experto en la técnica.

Los términos “de unión a IgG Fc” y “afinidad de unión a IgG Fc” como se utiliza en esta memoria descriptiva se refieren a una propiedad de un polipéptido que se puede analizar, por ejemplo, por el uso de tecnología de resonancia de plasmones superficiales, tal como en un instrumento Biacore (GE Healthcare). Por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, la afinidad de unión a IgG Fc se puede analizar en un experimento en el que se inmoviliza IgG Fc, o un fragmento de IgG Fc, sobre un chip sensor del instrumento y la muestra que contiene el polipéptido que se va a analizar se pasa sobre el chip. Alternativamente, el polipéptido que se va a analizar se inmoviliza en un chip sensor del instrumento, y una muestra que contiene IgG Fc, o uno de sus fragmentos, se pasa sobre el chip. El experto en la técnica puede interpretar entonces los resultados obtenidos en dichos experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido a IgG Fc. Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo para determinar un valor de  $K_D$  para la interacción, también se pueden usar métodos de resonancia de plasmones superficiales. Los valores de unión se pueden definir, por ejemplo, en un instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare). IgG Fc se inmoviliza sobre un chip sensor del instrumento y se preparan muestras del polipéptido cuya afinidad se ha de determinar por dilución en serie y se inyectan en orden aleatorio. Los valores de  $K_D$  se pueden calcular entonces a partir de los resultados usando, por ejemplo, el modelo de unión Langmuir 1:1 del programa informático *BIAevaluation* 4.1 proporcionado por el fabricante del instrumento.

Cuando se introducen sustituciones de aminoácidos, éstas no deben afectar a la estructura básica del polipéptido. Por ejemplo, el plegamiento global de la cadena principal de  $C\alpha$  del polipéptido puede ser esencialmente el mismo que el de un dominio de la proteína A, es decir, que tenga los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden. De este modo, los polipéptidos que tengan esta estructura básica tendrán espectros de CD que serán similares a los de un dominio de la proteína A de tipo natural. El destinatario experto es consciente de otros parámetros que pueden ser relevantes. El requisito para la conservación de la estructura básica impone restricciones en las

que las posiciones de la secuencia de aminoácidos pueden ser sometidas a sustitución. Por ejemplo, se prefiere que los residuos de aminoácidos situados en la superficie del polipéptido estén sustituidos, mientras que los residuos de aminoácidos enterrados dentro del núcleo del polipéptido en "haz de tres hélices" deben mantenerse constantes para preservar las propiedades estructurales de la molécula. El mismo razonamiento se aplica a fragmentos de polipéptidos de la invención.

Por tanto, la invención también abarca polipéptidos y composiciones en las que el polipéptido de unión a IgG Fc descrito anteriormente está presente como un dominio de unión a IgG Fc al que se han añadido en cualquiera de los extremos residuos de aminoácidos adicionales. Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden desempeñar un papel en la unión de IgG Fc por el polipéptido, pero pueden servir igualmente para otros fines, relacionados por ejemplo con uno o más de la producción, purificación, estabilización *in vivo* y/o *in vitro*, acoplamiento o detección del polipéptido. Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más residuos de aminoácidos añadidos con el fin de acoplamiento químico. Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden proporcionar una "etiqueta" para la purificación o detección del polipéptido, tal como una etiqueta His<sub>6</sub> o una etiqueta "myc" (c-myc) o una etiqueta "FLAG" para la interacción con anticuerpos específicos para la etiqueta.

La presente invención también abarca polipéptidos de unión a IgG Fc en los que está presente un polipéptido de unión a IgG Fc como se ha descrito anteriormente como un dominio de unión a IgG Fc al que se acoplan péptidos o proteínas adicionales u otros grupos funcionales N- o C-terminales o a cualquier otro residuo (específicamente o no específicamente) por medio de conjugación química (utilizando métodos conocidos de química orgánica).

Un polipéptido de acuerdo con la invención puede ser útil en cualquier método que se base en la afinidad por IgG Fc de un reactivo. Por tanto, el polipéptido se puede usar en dichos métodos como un reactivo de detección, un reactivo de captura o un reactivo de separación. En particular, como ya se ha indicado anteriormente, el polipéptido presenta diversas características que lo hacen útil como reactivo de afinidad en cromatografía, en donde el objetivo es separar, purificar y/o producir anticuerpos o proteínas de fusión con Fc a partir de una mezcla heterogénea. El polipéptido se puede unir a una matriz y por ejemplo utilizar para la purificación de compuestos terapéuticos que contienen IgG Fc en la producción industrial. Debido a propiedades tales como una alta afinidad por la diana, una alta estabilidad tanto en ambientes ácidos como básicos y selectividad para el fragmento IgG Fc mayor que para el fragmento IgG Fab, se cree que el polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención presenta una afinidad muy atractiva.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención es un método para aislar moléculas que comprenden IgG Fc a partir de un líquido, comprendiendo dicho método las etapas:

(i) proporcionar un líquido que contiene moléculas que comprenden IgG Fc;

(ii) poner en contacto el líquido con un polipéptido o composición de unión a IgG Fc como se describe en la presente invención, con lo que dichas moléculas que comprenden IgG Fc se unen al polipéptido o composición; y

(iii) aislar las moléculas unidas que comprenden IgG Fc del líquido.

En el método de aislamiento de la invención, el líquido puede proceder de un cultivo de células procariontas o eucariotas, tales como de mamíferos o plantas, que expresan moléculas que comprenden IgG Fc, o de la expresión de dichas moléculas en un sistema de expresión alternativo, por ejemplo un sistema vesicular. Alternativamente, el líquido puede proceder de la expresión transgénica en un hospedante, tal como un hospedante vegetal o mamíferos.

En el contexto de la presente invención, los términos "muestra" y "líquido" se pueden usar indistintamente. Ninguno de los dos términos implica limitaciones, por ejemplo respecto al volumen de líquido implicado u otras características. El líquido puede ser de un volumen pequeño, tal como una parte alícuota de un volumen mayor, por ejemplo con fines analíticos; o alternativamente, la alimentación o el líquido usado en un proceso de purificación a gran escala.

En algunas realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son moléculas de IgG o sus fragmentos. Por ejemplo, pueden ser moléculas de IgG humana o sus fragmentos. En algunas realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son anticuerpos IgG monoclonales. En particular, dichos anticuerpos IgG monoclonales pueden ser anticuerpos IgG monoclonales humanos. Por ejemplo, son anticuerpos IgG monoclonales humanos de la clase 1, 2 y/o 4.

En otras realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son proteínas de fusión Fc. El dominio Fc en dicha proteína de fusión puede así, ventajosamente, ser utilizado como un "asa de afinidad" en el aislamiento de la proteína de fusión. Se ha creado una gran variedad de proteínas de fusión con Fc. Por ejemplo, las proteínas de fusión con Fc que tienen aplicaciones terapéuticas incluyen etanercept, que es una fusión entre el receptor TNF- $\alpha$  soluble y Fc y VEGF Trap, que es una fusión entre los dominios del receptor VEGF y Fc (Holash *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99 (17):11393-11398). Aunque estos dos ejemplos son ilustrativos de gran interés, su enumeración no es limitativa y en principio es posible fusionar un dominio Fc con cualquier proteína deseada con el fin de modificar sus propiedades y facilitar su purificación por afinidad utilizando como ligando de afinidad el polipéptido o composición de unión a IgG Fc de la invención descrito en la presente memoria.

Incluso otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para producir moléculas que comprenden IgG Fc, comprendiendo dicho método las etapas:

- (i) expresar las moléculas deseadas que comprenden IgG Fc;
- (ii) obtener un líquido que contenga moléculas que comprenden IgG Fc a partir de dicha expresión;

5 (iii) poner en contacto el líquido con un polipéptido o composición de unión a IgG Fc como se describe en la presente memoria, con lo que las moléculas que comprenden IgG Fc se unen al polipéptido o composición;

- (iv) aislar las moléculas unidas que comprenden IgG Fc del líquido, y

(v) recuperar las moléculas unidas que comprenden IgG Fc por su elución a partir del polipéptido o composición de unión a IgG Fc.

10 La etapa de expresión (i) se puede realizar utilizando cualquier sistema de expresión conocido, por ejemplo expresión recombinante en células procariotas o eucariotas, tales como de mamíferos o vegetales, o en un sistema vesicular. El líquido también puede proceder de la expresión transgénica en un hospedante, tal como un hospedante mamífero o vegetal.

15 En algunas realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son moléculas de IgG o sus fragmentos. Por ejemplo, pueden ser moléculas de IgG humana o sus fragmentos. En algunas realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son anticuerpos IgG monoclonales. En particular, dichos anticuerpos IgG monoclonales pueden ser anticuerpos IgG monoclonales humanos. Por ejemplo, son anticuerpos IgG monoclonales humanos de la clase 1, 2 y/o 4.

En otras realizaciones, dichas moléculas que comprenden IgG Fc son proteínas de fusión con Fc.

20 En algunas realizaciones de los métodos de aislamiento y producción de la invención, el polipéptido o composición de unión a IgG Fc se inmoviliza sobre una matriz. En una realización, el presente polipéptido o composición ha sido acoplado a una matriz en forma de un portador insoluble. Dicho portador puede ser una o más partículas, tales como perlas, por ejemplo una resina para cromatografía; o formas irregulares; membranas; filtros; capilares; monolitos; y cualquier otro formato comúnmente utilizado en la separación y/o purificación de proteínas. Por tanto, en general, los  
25 métodos que emplean los polipéptidos y/o las composiciones de acuerdo con la invención *in vitro* se pueden realizar en diferentes formatos, tales como sobre filtros o membranas, placas de microtitulación, en matrices proteínicas, sobre superficies de biosensores, sobre perlas, en citometría de flujo, en cortes de tejidos, etc. En un aspecto específico, la invención proporciona un medio de cromatografía, que tiene un polipéptido o composición de unión a IgG Fc como se describe en la presente invención inmovilizado sobre sí mismo. Dicho medio puede estar basado en  
30 cualquier material para cromatografía conocido, como una matriz, y el acoplamiento del polipéptido o composición a la matriz se puede realizar usando uno cualquiera de los diversos procedimientos conocidos.

La numeración de los residuos de aminoácidos y cualquier uso del término "posición" en la secuencia del polipéptido de acuerdo con la invención es relativa. En un polipéptido de acuerdo con la invención que tenga tantos residuos de aminoácidos como un polipéptido descrito específicamente, es decir, los descritos anteriormente, las posiciones de aminoácidos en el polipéptido corresponden exactamente a las de los polipéptidos descritos. En una situación en la que haya, por ejemplo, una extensión N-terminal en comparación con los polipéptidos descritos, los residuos de aminoácidos en el péptido extendido que corresponden a los del péptido no extendido tendrán los mismos números de posición. Por ejemplo, si hay una extensión de seis aminoácidos en el polipéptido extendido, entonces el aminoácido número siete de ese polipéptido modificado, contando desde el extremo N, corresponde al aminoácido en la  
40 posición número uno del polipéptido descrito.

La invención es ilustrada además por los siguientes ejemplos no limitativos.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una tabla que muestra información sobre la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Las SEQ ID NO:1-6 son ejemplos no limitativos de polipéptidos de acuerdo con la invención, mientras que las SEQ ID NO:7-9 se describen con fines ilustrativos y/o comparativos.  
45

La Figura 2 es un cromatograma del análisis por HPLC/MSD de una muestra de His<sub>6</sub>-Z05494 después de tratamiento con ácido fosfórico 5 M. El pico señalado con I corresponde a la molécula His<sub>6</sub>-Z05494 escindida (7052 Da), no escindida (9179 Da) y modificada (7268 Da).

La Figura 3 es un cromatograma del análisis por HPLC/MSD de una muestra de His<sub>6</sub>-Z05494 después de tratamiento con ácido clorhídrico 2 M durante 1 hora a 50°C. El pico señalado con I corresponde a la molécula His<sub>6</sub>-Z05494 escindida (7052 Da), no escindida (9179 Da) y modificada (7268 Da). El pico señalado con II corresponde a la etiqueta de hexahistidilo (2145 Da).  
50

La Figura 4 es un cromatograma del análisis por HPLC/MSD de una muestra de His<sub>6</sub>-Z05494 después de tratamiento con ácido fosfórico 6 M durante 1 hora a 50°C. El pico señalado con I corresponde a la molécula His<sub>6</sub>-Z05494 escindida (7052 Da) y no escindida (9179 Da).

### Ejemplo 1

#### 5 Escisión de una secuencia de dipéptido DP

La molécula Z05494 de Affibody® de unión a HER2 (SEQ ID NO:8 en la Figura 1) se construyó a partir de Z02891 (SEQ ID NO:7 en la Figura 1) reemplazando el ácido aspártico en la posición 37 de Z02891 por un ácido glutámico. A continuación se usó la molécula Z05494 en el experimento descrito en la presente memoria con fines ilustrativos. El gen mutado se insertó en un vector de expresión que contenía el promotor T7 y que codificaba una cola de hexahistidina (His<sub>6</sub>) seguido por una secuencia de dipéptidos DP que permitía la escisión por ácido. La proteína expresada, que tenía la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 (Figura 1) y se denominó His<sub>6</sub>-Z05494, se recolectó como un producto soluble con la metionina de partida eliminada.

Después de la expresión, las células se lisaron por calentamiento y el producto His<sub>6</sub>-Z05494 soluble se purificó por IMAC seguido de cromatografía en fase inversa. La proteína se dividió en partes alícuotas en viales en porciones de 1 mg y 5 mg y se liofilizó.

Se preparó una serie de diluciones de 12 M, 10 M, 8 M, 6 M, 4 M, 2 M y 0,2 M de cada uno de los siete ácidos siguientes: ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH), ácido fórmico (HCOOH), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO<sub>2</sub>) y ácido trifluoroacético (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H). La molécula His<sub>6</sub>-Z05494 liofilizada se diluyó en agua desionizada hasta una concentración final de 4 mg/mL. Se prepararon siete tubos Eppendorf por ácido, conteniendo todos ellos 25 µL de His<sub>6</sub>-Z05494. Se añadieron a los tubos Eppendorf 25 µL de ácido y se dejaron incubarse a 37°C durante 17 horas 30 minutos (durante una noche).

La escisión catalizada por ácido se detuvo aumentando el pH hasta 7,5-8,5 por adición de diferentes concentraciones de NaOH y 125 µL de Tris-HCl 2 M, pH 8. Todas las muestras se analizaron con SDS-PAGE y se cargaron en un equipo de HPLC/MSD.

El análisis por HPLC/MSD mostró que los ácidos débiles, ácido acético y ácido fórmico, escindieron una cantidad muy pequeña de proteína a una concentración de 5-6 M, y nada en absoluto a menores concentraciones. El ácido fosfórico 5 M fue una excepción a los resultados de los ácidos débiles en general, y escindió grandes cantidades de la molécula His<sub>6</sub>-Z05494. La Figura 2 es un diagrama del análisis por HPLC/MSD de la muestra tratada con ácido fosfórico 5 M, y se observa que el componente principal es la molécula escindida. Sin embargo, también se detectaron en la muestra pequeñas cantidades de moléculas no escindidas y de molécula escindida modificada.

El ácido nítrico era demasiado potente para el experimento de escisión, cortando la proteína de forma irregular. El ácido trifluoroacético no cortó la proteína en el sitio de escisión, lo que dio lugar a resultados que eran difíciles de interpretar. El ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico mostraron resultados similares. A menores concentraciones, es decir, un ácido desde alrededor de 1 a 3 M, fue escindida la mayor parte de la proteína. Los resultados del análisis por HPLC/MSD confirman que la molécula His<sub>6</sub>-Z05494 fue escindida, pero el resultado estuvo muy lejos de ser perfecto e indicaba que los experimentos de escisión no eran óptimos. En casi todos los casos, se detectó una cantidad significativa de molécula escindida con una masa extra de +216 Da.

Los resultados con ácido fosfórico y ácido clorhídrico fueron los más favorables, y se realizaron experimentos adicionales con estos dos ácidos. Se prepararon series de dilución para HCl con las concentraciones 7 M, 6 M y 4 M y para H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> con las concentraciones 12 M, 10 M y 8 M. Se usó un tampón diferente (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 M, pH 7,4) para determinar si el tampón Tris podría haber dado como resultado la modificación de la molécula His<sub>6</sub>-Z05494. La escisión se realizó a 100°C, 80°C y 50°C y se detuvo después de 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h aumentando el pH por adición de una concentración apropiada de NaOH y 125 µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 M, pH 7,4. Las muestras se analizaron en gel de SDS-PAGE y se cargaron en un equipo de HPLC/MSD.

La espectrometría de masas confirmó que las temperaturas de 100°C y 80°C eran claramente demasiado altas para la escisión química y dieron como resultado una proteína totalmente fragmentada con ambos ácidos. La escisión realizada a 50°C dio mejores resultados, pero confirmó que cuando se usaba una alta concentración de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como tampón, el resultado de la espectroscopia de masas se veía afectado a medida que precipitaba el fosfato. La alta concentración de fosfato en las muestras condujo a un alto grado de modificaciones en la molécula His<sub>6</sub>-Z05494 escindida con una masa extra de +79 Da. También se detectó una molécula His<sub>6</sub>-Z05494 escindida con una masa de 7269 Da, que es una masa extra de +216 Da. Los mejores resultados de escisión con ácido clorhídrico se consiguieron con las concentraciones 2 M y 3 M durante 1-3 horas. Con ácido fosfórico, la mejor escisión se realizó utilizando ácido 5-6 M durante 1-4 horas. Las Figuras 3 y 4 ilustran diagramas para obtener los mejores resultados con ácido clorhídrico y ácido fosfórico, respectivamente.

En resumen, los experimentos descritos anteriormente muestran que el dipéptido DP puede ser escindido satisfactoriamente usando hidrólisis catalizada por ácido, cuando esta secuencia de dipéptidos está presente en un espacio-

dor que precede a un dominio de proteína en haz de tres hélices, tal como el dominio de unión a IgG Fc en haz de tres hélices presente en el polipéptido de acuerdo con la invención.

## Ejemplo 2

5 Consideraciones sobre el diseño en la preparación de una composición de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención

Se realizó un experimento piloto con el fin de evaluar la longitud óptima de un enlazador polimérico en una composición de unión a IgG Fc de acuerdo con la invención, con vistas a unir dos anticuerpos monoclonales (mAb) con dos polipéptidos de unión a IgG Fc en los que  $n = 1$ , es decir, dos dominios individuales, acoplados "cola con cola" por medio de sus respectivos residuos de  $C_{CTERM-1}$  sobre un enlazador de poli(etilenglicol) (PEG). El enlazador óptimo es suficientemente largo para permitir la unión de dos mAb sin interferencia estérica, pero no lo suficientemente largo para permitir que ambos dominios de unión a IgG Fc se unan al mismo mAb. El PEG homobifuncional, reactivo con tiol (Bismaleimida-dPEG) se puede adquirir a Quanta Biodesign Ltd. El catálogo contiene variantes que tienen 3 u 11 unidades de etilenglicol, pero están disponibles otras alternativas si se solicitan. Se ha encontrado un enlazador de longitud adecuada cuando los dos dominios de unión a IgG Fc conectados por un PEG no tienen preferencia por la unión al mismo anticuerpo, sino que se unen a dos anticuerpos separados. De este modo, están disponibles retículos de anticuerpos y dominios de unión a IgG Fc conjugados con PEG.

El experimento de optimización comienza preferiblemente con una evaluación de las dos longitudes enlazadoras comercialmente disponibles, y luego continúa con enlazadores de longitudes intermedias, o con una longitud de más de 11 unidades de etilenglicol. La orientación cola con cola de los dos polipéptidos de unión a IgG Fc permite la separación de los dominios por rotación alrededor del mismo "eje", y por tanto proporciona una mayor distancia entre las superficies de unión, en comparación con una situación en la que haya una orientación "cabeza con cola" usando un espaciador de las mismas longitudes. Una orientación "cabeza con cola" da típicamente como resultado la expresión recombinante de varios dominios de unión a IgG Fc en serie, como una proteína de fusión multimérica separada por espaciadores peptídicos.

Un experimento con el objetivo de evaluar qué retículos de polipéptidos de unión y mAb se obtienen se realiza usando un anticuerpo IgG1 humano (o una mezcla de anticuerpos IgG1 humanos). Después de incubación de la composición de unión a IgG Fc con los mAb en condiciones adecuadas, se analizan los complejos formados usando cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC) y el resultado se confirma por análisis de espectrometría de masas de alto peso molecular. En el experimento SEC, los tamaños de los complejos formados se determinan por comparación con un patrón de tamaños de referencia. Partiendo de una longitud de enlazador que produce principalmente retículos y complejos mayores que 1:1 (con referencia a complejos de un dímero unido a PEG de dominios de unión a IgG y una molécula de IgG), se investiga la cantidad de complejos 1:1 formados con una longitud de enlazador reducida sucesivamente. El PEG de longitud óptima contiene una o dos unidades de etilenglicol menos que la longitud que muestra un claro aumento en la cantidad de complejo 1:1 encontrado. Preferiblemente, se utiliza una molécula de PEG que tenga dos unidades menos, si esto no da lugar a un aumento en el contenido de complejo 1:1 en comparación con una molécula que tenga una unidad de etilenglicol menos. Por debajo de cierta longitud, el enlazador será demasiado corto para permitir la formación de retículos.

Se realiza entonces un segundo experimento de optimización para evaluar la longitud óptima que permita que un trímero (es decir, tres dominios monoméricos de polipéptido de unión a IgG Fc acoplados equidistantemente en la misma cadena de PEG) se una a tres mAb separados. Lo mismo se hace entonces con un tetrámero, investigando la unión de cuatro mAb.

Como se describe en el párrafo general anterior, la composición de acuerdo con la invención se puede conectar adecuadamente a una matriz o medio de cromatografía. Con el fin de encontrar la longitud óptima del enlazador polimérico que conecta la composición a la matriz, el punto de partida es investigar un enlazador que sea al menos tan largo como el enlazador entre los dominios de unión a IgG Fc. Además, la naturaleza química del grupo utilizado para la unión a la matriz es preferiblemente diferente de la maleimida usada para la conjugación de los dominios de unión a IgG Fc con el polímero enlazador. La activación de un grupo reactivo puede ser realizada ya sea por una base o un ácido, debido a la estabilidad del dominio polipeptídico frente a ambas condiciones. Como ejemplos no limitativos de productos químicos que pueden ser adecuados, Quanta Biodesign Ltd fabrica PEG que tiene un éster t-butilico así como derivados de tosilato que pueden ser activados y utilizados para productos químicos patentados, y un azido-PEG que puede ser usado en reacciones de química clic. Alternativas adicionales son bien conocidas en la técnica.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AFFIBODY AB Abrahmsén, Lars

5 <120> POLIPÉPTIDO

<130> 21051179

<150> EP10155835

10 <151>08-03- 2010

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Modificada

<400> 1  
 Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 1 5 10 15  
 His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys  
 20 25 30  
 Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45  
 Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Gly Cys Asp  
 50 55

25

<210> 2  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Modificada

35 <400> 2  
 Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 1 5 10 15  
 His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys  
 20 25 30  
 Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45  
 Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Gly Cys Asp  
 50 55

40 <210> 3  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 641 896 T3

<220>

<223> Modificada

5

<400> 3

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
1 5 10 15

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys  
20 25 30

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys  
35 40 45

Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys  
50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser  
85 90 95

Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asn Glu Ala Gln  
100 105 110

Ala Gly Cys Asp  
115

<210> 4

<211> 116

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Modificada

15

<400> 4

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
1 5 10 15

His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys  
20 25 30

ES 2 641 896 T3

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45

Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys  
 50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser  
 85 90 95

Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asp Glu Ala Gln  
 100 105 110

Ala Gly Cys Asp  
 115

5 <210> 5  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Modificada

<400> 5  
 Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp  
 50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro  
 85 90 95

Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asn Glu Ala  
 100 105 110

15 Gln Ala Gly Cys  
 115

<210> 6  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

ES 2 641 896 T3

<220>

<223> Modificada

<400> 6

Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp  
50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Thr Leu  
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro  
85 90 95

Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asp Glu Ala  
100 105 110

5 Gln Ala Gly Cys  
115

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Modificada

15 <400> 7

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

20 <210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Modificada

ES 2 641 896 T3

<400> 8

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 9

5 <211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Modificada

<400> 9

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Ser Ser Gly Val Asp  
1 5 10 15

Leu Gly Thr Asp Pro Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn  
20 25 30

Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys  
35 40 45

Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ser Glu  
50 55 60

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val  
65 70 75 80

15 Asp

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión a la región Fc de la inmunoglobulina G, que comprende la secuencia de aminoácidos:
- i)  $X_1$ -([*espaciador1*]-KFDKEQQN AFYEIL $X_{17}$ LP $X_{20}$  LTEEQRNAFI  
 QKLDX $X_{36}$ PSQS AELLAEAKQL  $X_{51}$ EAQA-[*espaciador2*]) $_n$ -C<sub>CTERM-1</sub> $X_{CTERM}$
- 5 en donde, independientemente uno de otro,  
 $X_1$  es P;  
 [*espaciador1*] es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1-3 residuos de aminoácidos;  
 $X_{17}$  es cualquier residuo de aminoácidos;  
 $X_{20}$  es cualquier residuo de aminoácidos;
- 10  $X_{36}$  es E o A;  
 $X_{51}$  es cualquier residuo de aminoácidos;  
 [*espaciador2*] es una secuencia de aminoácidos que consiste en 0-20 residuos de aminoácidos;  
 $X_{CTERM}$  es D; y  
 n es 1-4.
- 15 2. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el [*espaciador1*] se selecciona de A, AE y AEA.
3. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde  $X_{17}$  es H.
- 20 4. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde  $X_{20}$  es N o T.
5. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde [*espaciador2*] es G.
6. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde  $X_{51}$  es N o D.
- 25 7. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde todos los residuos de aminoácidos del [*espaciador2*] se seleccionan independientemente de A, E, F, G, I, K, L, P, Q, R, S, T y V, en particular de A, E, G, K, P, Q, R, S y T, tal como de G, Q y S.
8. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se une a IgG Fc de tal manera que el valor de  $K_D$  de la interacción es como máximo  $1 \times 10^{-6}$  M, tal como máximo  $1 \times 10^{-7}$  M o como máximo  $5 \times 10^{-8}$  M.
- 30 9. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es capaz de unirse a la porción Fc de una molécula de IgG humana, tales como las clases 1, 2 y 4 de IgG humana.
10. Un polipéptido de unión a IgG Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde  $X_1$  es P y  $X_{CTERM}$  es D y en donde la secuencia de aminoácidos i) se selecciona de SEQ ID NO:1-4.
- 35 11. Un polipéptido multímero que comprende al menos dos subunidades, siendo cada subunidad un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1; y un péptido guía N-terminal que comprende un residuo D como su último residuo.
12. Una composición de unión a IgG Fc, que comprende al menos un polipéptido, tal como de uno a cuatro polipéptidos, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, unido cada uno covalentemente a un polímero enlazador no ácido nucleico y no péptido por medio del residuo de cisteína  $C_{CTERM-1}$ .
- 40 13. Un método para aislar moléculas que comprenden IgG Fc a partir de una muestra, comprendiendo dicho método las etapas:
- (i) proporcionar un líquido que contiene moléculas que comprenden IgG Fc;

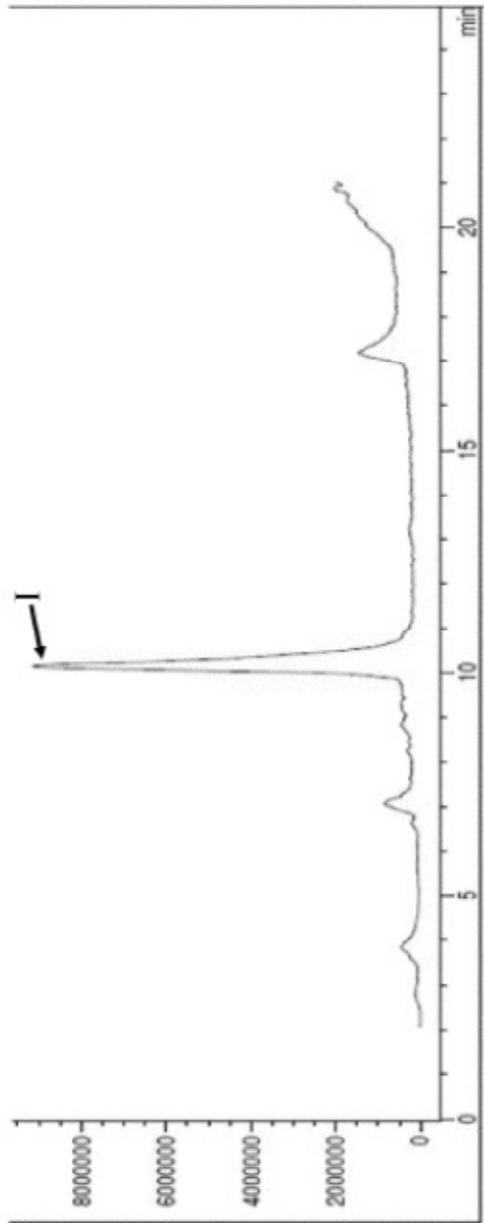
(ii) poner en contacto el líquido con un polipéptido o composición de unión a IgG Fc de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12, por lo que dichas moléculas que comprenden IgG Fc se unen al polipéptido o composición;

(iii) aislar las moléculas unidas que comprenden IgG Fc del líquido.

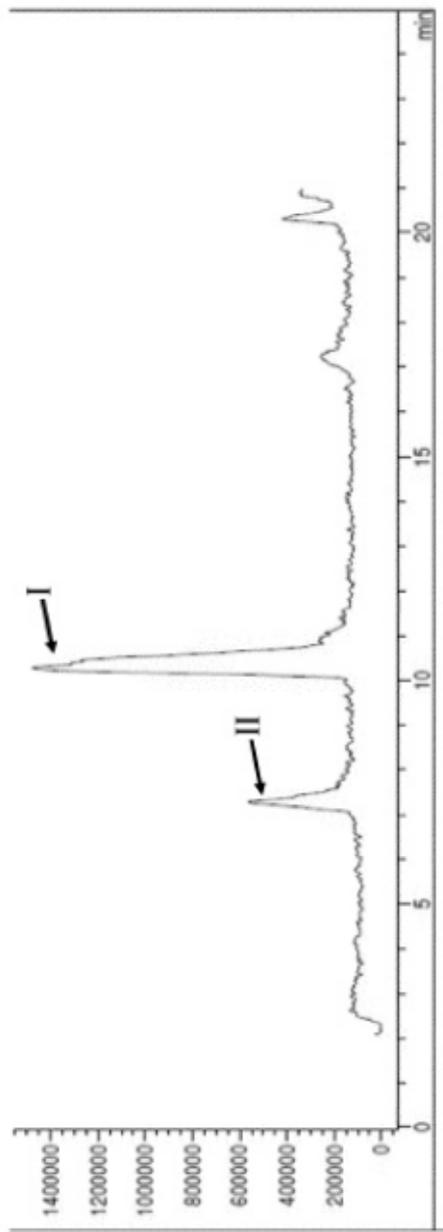
- 5 14. Un polipéptido o composición de unión a IgG Fc de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12 unido covalentemente a una matriz insoluble.

SEQ ID NO:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGCD
2	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGCD
3	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGCD
4	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGCD
5	AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGC
6	AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNFAF IQKLDKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGC
7	VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK
8	VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDEPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK
9	GSSHHHHHL QSSGVDLGTD P VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDEPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKVD

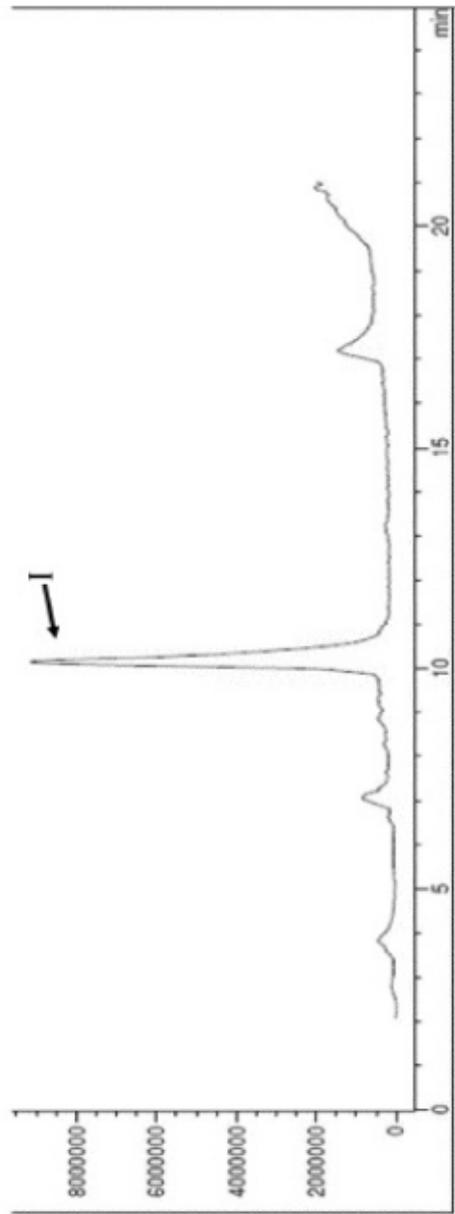
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**