

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 386**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2007 PCT/EP2007/058887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2008 WO08025748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2007 E 07802925 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2061803**

54 Título: **Proceso para la purificación de proteínas que contienen fragmentos Fc**

30 Prioridad:

28.08.2006 EP 06119611
06.09.2006 US 842542 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2020

73 Titular/es:

ARES TRADING S.A. (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ouriettaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es:

EON-DUVAL, ALEX y
LAMPROYE, ALAIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 755 386 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

Proceso para la purificación de proteínas que contienen fragmentos Fc

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está dentro del campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, se refiere a la purificación de una proteína que contiene fragmentos Fc mediante cromatografía de intercambio catiónico, en particular, para la reducción de la cantidad de restos Fc libres en una preparación de proteína que contiene Fc.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las proteínas han alcanzado importancia en el mercado como fármacos que generalmente se denominan «fármacos biológicos». Uno de los mayores desafíos es el desarrollo de procesos rentables y eficientes para la purificación de proteínas a escala comercial. Aunque en la actualidad hay disponibles muchos métodos para la producción de proteínas a gran escala, los productos sin procesar, como los sobrenadantes de cultivo celular, contienen no solo el producto deseado sino también impurezas, que son difíciles de separar del producto deseado. Aunque los sobrenadantes de cultivos de células que expresan productos de proteínas recombinantes pueden contener menos impurezas si las células se crecen en medio sin suero, sigue siendo necesario eliminar las proteínas de la célula huésped (PCH) durante el proceso de purificación. Por otra parte, las autoridades sanitarias demandan altos estándares de pureza para las proteínas destinadas a la administración a seres humanos.

Se conocen varios sistemas cromatográficos que se utilizan ampliamente para la purificación de proteínas.

25 Los sistemas cromatográficos de intercambio iónico se utilizan para la separación de proteínas, principalmente en base a diferencias de carga. Por ejemplo, en el documento WO 2004/076485 A1 se describe un método de purificación de anticuerpos utilizando proteína A y cromatografía de intercambio iónico.

Los intercambiadores aniónicos pueden clasificarse como débiles o fuertes. El grupo de carga de un intercambiador aniónico débil es una base débil, que se desprotona y, por tanto, pierde su carga a pH alto. La DEAE-sepharose es un ejemplo de un intercambiador aniónico débil, en el que el grupo amino puede estar cargado positivamente por debajo de pH ~ 9 y puede perder gradualmente su carga a valores de pH más altos. El dietilaminoetilo (DEAE) o el dietil-(2-hidroxi-propil)aminoetilo (QAE) tienen cloruro como contraión, por ejemplo. Un intercambiador aniónico fuerte, por otro lado, contiene una base fuerte, que sigue cargada positivamente a lo largo de todo el intervalo de pH utilizado normalmente para la cromatografía de intercambio iónico (pH 1-14). La Q-sepharose (Q significa amonio cuaternario) es un ejemplo de intercambiador aniónico fuerte.

Los intercambiadores catiónicos pueden clasificarse como débiles o fuertes. Un intercambiador catiónico fuerte contiene un ácido fuerte (como un grupo sulfopropilo) que permanece cargado entre pH 1 y 14, mientras que un intercambiador catiónico débil contiene un ácido débil (como un grupo carboximetilo), que pierde gradualmente su carga si el pH disminuye por debajo de 4 o 5. El carboximetilo (CM) y el sulfopropilo (SP) tienen sodio como contraión, por ejemplo.

Una resina de cromatografía diferente se basa en una matriz de fosfato cálcico hidroxilado insoluble denominada hidroxiapatita. La cromatografía en hidroxiapatita es un método para la purificación de proteínas que utiliza un fosfato cálcico hidroxilado insoluble $(Ca_5(PO_4)_3OH)_2$, que forma tanto la matriz como el ligando. Los grupos funcionales constan de pares de iones de calcio cargados positivamente (sitios C) y agregados de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones entre la hidroxiapatita y las proteínas son complejas y multimodales. En un método de interacción, los grupos amino cargados positivamente de las proteínas se asocian con los sitios P cargados negativamente y los grupos carboxilo de las proteínas interaccionan mediante acomplejamiento coordinado con los sitios C (Shepard y cols., 2000).

La hidroxiapatita cristalina fue el primer tipo de hidroxiapatita utilizado en cromatografía. La cromatografía en hidroxiapatita cerámica (CHA) representa un desarrollo adicional de la cromatografía en hidroxiapatita. La hidroxiapatita cerámica tiene una alta durabilidad, una buena capacidad de unión a proteínas y puede usarse con caudales y presiones más altos que la hidroxiapatita cristalina (Vola y cols., 1993).

La hidroxiapatita se ha usado en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos. En la cromatografía en hidroxiapatita, normalmente se equilibra la columna, y se aplica la muestra, en una concentración baja de tampón fosfato y, a continuación, las proteínas adsorbidas se eluyen en un gradiente de concentración de tampón fosfato (Gionannini y cols., 2000).

Aún una forma adicional de purificación de proteínas se basa en la afinidad de una proteína de interés por otra proteína que se inmoviliza en una resina de cromatografía. Son ejemplos de estos ligandos inmovilizados las proteínas de la pared celular bacteriana proteína A y proteína G, que tienen especificidad por la porción Fc de determinadas

inmunoglobulinas. Aunque tanto la proteína A como la proteína G tienen una fuerte afinidad por anticuerpos IgG, presentan también afinidades variables por otras clases e isotipos de inmunoglobulinas.

5 La proteína A es una proteína de 43000 Daltons producida por la bacteria *Staphylococcus aureus* y contiene cuatro sitios de unión a las regiones Fc de la IgG. La proteína G es producida por estreptococos del grupo G y tiene dos sitios de unión para la región Fc de la IgG. Se ha caracterizado ampliamente la afinidad de ambas proteínas por diversos tipos de inmunoglobulinas. Otro desarrollo es la proteína A/G, una proteína modificada por ingeniería genética que combina las capacidades de unión de las proteínas A y G. La proteína L es otra proteína bacteriana, que se origina a partir de *Peptostreptococcus* y se une a las inmunoglobulinas y sus fragmentos que contienen cadenas ligeras de Ig
10 (Akerstrom y Bjork, 1989).

La cromatografía de afinidad a proteína A, proteína G y proteína L se utiliza ampliamente para el aislamiento y purificación de anticuerpos.

15 Puesto que los sitios de unión para la proteína A y la proteína G se encuentran en la región Fc de una inmunoglobulina, la cromatografía de afinidad a proteína A y proteína G (o proteína A/G) también permite la purificación de las denominadas proteínas de fusión Fc. La proteína L se une a las cadenas ligeras y puede, por tanto, utilizarse para la purificación de anticuerpos que contienen cadenas ligeras.

20 Los anticuerpos, o inmunoglobulinas (Ig), constan de cadenas ligeras y cadenas pesadas unidas mediante puentes disulfuro. El primer dominio localizado en el extremo amino terminal de cada cadena presenta una secuencia de aminoácidos variable, lo que proporciona el amplio espectro de especificidades de unión del anticuerpo. Estos dominios se conocen como regiones variables de la cadena pesada (VH) y regiones variables de la cadena ligera (VL). Los demás dominios de cada cadena tienen una secuencia de aminoácidos relativamente invariable y se conocen como regiones constantes de la cadena pesada (CH) y regiones constantes de la cadena ligera (CL).
25

Las clases principales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; estas clases pueden además dividirse en subclases (isotipos). Por ejemplo, la clase IgG tiene cuatro subclases, en concreto, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

30 Las diferencias entre las clases de anticuerpos derivan de las diferencias en las regiones constantes de la cadena pesada, que contiene entre 1 y 4 dominios constantes (CH1-CH4), dependiendo de la clase de inmunoglobulina. Entre los dominios CH1 y CH2 se localiza una región denominada bisagra. La región bisagra es especialmente sensible a la escisión proteolítica; dicha proteólisis da lugar a dos o tres fragmentos dependiendo del sitio preciso de escisión. La parte de la región constante de la cadena pesada que contiene los dominios CH2 y CH3 también se denomina parte «Fc» de la inmunoglobulina. Por tanto, los anticuerpos son proteínas que contienen Fc. Otro tipo de proteínas que contienen Fc son las denominadas proteínas de fusión Fc.
35

Se conocen varios anticuerpos que se utilizan como proteínas terapéuticas. Son ejemplos de anticuerpos recombinantes comercializados: abciximab, rituximab, basiliximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, cetuximab, efalizumab, ibritumomab, bevacizumab u omalizumab.
40

Las proteínas de fusión Fc son proteínas quiméricas que constan de una región efectora de una proteína, como la región Fab de un anticuerpo o la región de unión de un receptor, fusionada con la región Fc de una inmunoglobulina que con frecuencia es una inmunoglobulina G (IgG). Las proteínas de fusión Fc se utilizan ampliamente como fármacos ya que ofrecen las ventajas conferidas por la región Fc, como por ejemplo:
45

- La posibilidad de su purificación usando cromatografía de afinidad a proteína A o proteína G con afinidades que varían según el isotipo de IgG. Las IgG₁, IgG₂ e IgG₄ humanas se unen fuertemente a la proteína A y todas las IgG, incluida la IgG₃, se unen fuertemente a la proteína G;
- 50 - Un aumento de la semivida en el sistema circulatorio, ya que la región Fc se une al receptor FcRn nativo, protegiéndolo de la degradación lisosomal;
- Dependiendo del uso médico de la proteína de fusión Fc, pueden ser convenientes las funciones efectoras del Fc. Entre estas funciones efectoras se incluyen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) a través de interacciones con receptores Fc (FcγR) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediante la unión al componente del complemento 1q (C1q). Las isoformas de IgG muestran diferentes niveles de las funciones efectoras. Las IgG₁ e IgG₃ humanas muestran efectos ADCC y CDC fuertes mientras que la IgG₂ ejerce efectos ADCC y CDC débiles. La IgG₄ humana muestra efectos ADCC débiles y ningún efecto CDC.
55

60 La semivida en suero y las funciones efectoras pueden modularse modificando mediante ingeniería genética la región Fc para aumentar o reducir su unión a FcRn, FcγR y C1q respectivamente, dependiendo del uso terapéutico deseado para la proteína de fusión Fc.

En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a receptores Fc (FcyR) sobre la superficie de células inmunitarias efectoras como los linfocitos citolíticos naturales (células *natural killer*) y los macrófagos, que llevan a la fagocitosis o a la lisis de las células diana.

5 En la CDC, los anticuerpos matan a las células diana desencadenando la cascada del complemento en la superficie celular. Las isoformas de IgG ejercen diferentes niveles de funciones efectoras que aumentan en el orden de $IgG_4 < IgG_2 < IgG_1 \leq IgG_3$. La IgG₁ humana muestra altas ADCC y CDC y es la más adecuada para su uso terapéutico frente a patógenos y células cancerosas.

10 En determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando no se desea la depleción de la célula diana, puede que sea necesario anular o disminuir las funciones efectoras. Por el contrario, en el caso de anticuerpos destinados a su uso en oncología, el aumento de las funciones efectoras puede mejorar su actividad terapéutica (Carter y cols. 2006).

15 La modificación de las funciones efectoras puede lograrse mediante ingeniería genética de la región Fc mejorando o reduciendo la unión a los FcyR o a los factores del complemento.

20 La unión de la IgG a los FcyR activadores (FcyRI, FcyRIIa, FcyRIIIa y FcyRIIIb) e inhibidor (FcyRIIb) o el primer componente del complemento (C1q) depende de los restos localizados en la región bisagra y en el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para la unión a los FcyR y a Cq1 del complemento y tienen secuencias exclusivas en IgG₂ e IgG₄. Por ejemplo, la sustitución de los restos de las posiciones 233-236 de la IgG₂ dentro de la IgG₁ humana reducía en gran medida la ADCC y la CDC (Armour y cols., 1999 y Shields y cols., 2001).

25 Se han realizado numerosas mutaciones en el dominio CH2 de la IgG y se han comprobado *in vitro* sus efectos sobre la ADCC y CDC (Shields y cols., 2001, Idusogie y cols., 2001 y 2000, Steurer y cols., 1995). En particular, se describió una mutación en la alanina E333 que aumentaba tanto la ADCC como la CDC (Idusogie y cols., 2001 y 2000).

30 El aumento de la semivida en suero de un anticuerpo terapéutico es otra forma de mejorar su eficacia, lo que permite niveles en circulación mayores, una administración menos frecuente y la reducción de las dosis. Esto puede conseguirse mejorando la unión de la región Fc al FcR neonatal (FcRn). El FcRn, que se expresa sobre la superficie de las células endoteliales, se une a la IgG de forma dependiente de pH protegiéndola así de la degradación. Se ha demostrado que varias mutaciones localizadas en la interfaz entre los dominios CH2 y CH3 aumentan la semivida de la IgG₁ (Hinton y cols., 2004 y Vaccaro y cols., 2005).

35 En la tabla 1 a continuación se resumen algunas de las mutaciones conocidas de la región Fc de la IgG

Fc genéticamente modificado	Isotipo de IgG	Mutaciones	Propiedades	Posibles beneficios	Aplicaciones
hlgG1e1	IgG1 humana	T250Q/M428L	Aumento de la semivida en plasma	Mejora de la localización de la diana; aumento de la eficacia; reducción de la dosis o de la frecuencia de administración	Vacunación; uso terapéutico
hlgG1e2	IgG1 humana	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Aumento de la semivida en plasma	Mejora de la localización de la diana; aumento de la eficacia; reducción de la dosis o de la frecuencia de administración	Vacunación; uso terapéutico
hlgG1e3	IgG1 humana	E233P/L234V/L235A/ Δ G236 + A327G/A330S/P331S	Reducción de ADCC y CDC	Reducción de la incidencia de acontecimientos adversos	Uso terapéutico sin depleción celular
hlgG1e4	IgG1 humana	E333A	Aumento de ADCC y CDC	Aumento de la eficacia	Uso terapéutico con depleción celular
hlgG2e1	IgG2 humana	K322A	Reducción de CDC	Reducción de la incidencia de acontecimientos adversos	Vacunación; uso terapéutico

Una clase de proteínas de fusión Fc con utilidad terapéutica, se han fusionado regiones Fc a dominios extracelulares de determinados receptores pertenecientes a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R)

(Locksley y cols., 2001, Bodmer y cols., 2002, Bossen y cols., 2006). Un rasgo característico de los miembros de la familia del TNFR es la presencia de pseudorrepeticiones ricas en cisteína en el dominio extracelular, como se describe por ejemplo, en Naismith y Sprang, 1998.

5 Los dos receptores de TNF, TNFR p55 (TNFR1) y p75 (TNFR2) son ejemplos de estos miembros de la superfamilia del TNFR. Etanercept es una proteína de fusión Fc que contiene la parte soluble del TNFR p75 (p. ej., documento WO91/03553, documento WO 94/06476). Este se comercializa con el nombre comercial de Enbrel® para el tratamiento de la endometriosis, infección por el virus de la hepatitis C, infección por VIH, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, asma, espondilitis anquilosante, insuficiencia cardíaca, enfermedad injerto contra huésped, fibrosis pulmonar y enfermedad de Crohn. Lenercept es una proteína de fusión que contiene componentes extracelular del receptor de TNF humano p55 y la porción Fc de la IgG humana, y está destinado al posible tratamiento de la septicemia grave y la esclerosis múltiple.

15 OX40 es también un miembro de la superfamilia del TNFR. Se han preparado proteínas de fusión OX40-IgG1 y OX40-IgG4mut para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias como la enfermedad de Crohn.

Se está desarrollando una proteína de fusión Fc del BAFF-R, también llamado BR3, que se denominó BR3-Fc, que es un receptor señuelo soluble de una serie de inhibidores de BAFF (factor de activación de células B de la familia TNF), para el posible tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide (AR) y el lupus eritematoso sistémico (LES).

BCMA es otro receptor que pertenece a la superfamilia del TNFR. Se ha descrito una proteína de fusión BCMA-Ig que inhibe la enfermedad autoinmunitaria (Melchers, 2006).

25 Otro receptor de la superfamilia del TNF-R es TACI, el activador transmembrana y el interactuador CAML (von Bülow y Bram, 1997; documento US 5 969 102, Gross y cols., 2000), que tiene un dominio extracelular que contiene dos pseudorrepeticiones ricas en cisteína. TACI se une a dos miembros de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF). Un ligando se denomina BLyS, BAFF, neuroquina- α , TALL-1, zTNF4 o THANK (Moore y cols., 1999). El otro ligando se ha denominado APRIL, ligando de muerte TNRF-1 o ZTNF2 (Hahne y cols., J. Exp.Med. 188: 1185 [1998]).

También se conocen proteínas de fusión que contienen formas solubles del receptor TACI fusionado a una región Fc de la IgG que se denominan TACI-Fc (documento WO 00/40716, documento WO 02/094852). TACI-Fc inhibe la unión de BLyS y APRIL a las células B (Xia y cols., 2000). Se está desarrollando para el tratamiento de enfermedades, como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y neoplasias malignas hematológicas, así como para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). Además de esto, TACI-Fc se está desarrollando en el mieloma múltiple (MM) (Novak y cols. 2004; Moreau y cols., 2004) y linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW).

40 Debido a la utilidad terapéutica de las proteínas que contienen Fc, especialmente anticuerpos y proteínas de fusión Fc, existe una necesidad de cantidades significativas de proteína altamente purificada que sea adecuada para la administración a seres humanos.

45 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

50 Uno de los problemas que puede encontrarse durante la producción de proteínas que contienen Fc es la presencia de «restos Fc libres», es decir, fragmentos de polipéptido derivados de la proteína que contiene Fc, que no contienen una porción sustancial derivada de una región variable de anticuerpo o de otra proteína o dominio específico normalmente presente en la proteína de fusión Fc.

55 La presente invención aborda este problema. Esta se basa en el desarrollo de un proceso de purificación para un líquido, composición o preparación de una proteína que contiene Fc, por el que puede reducirse la cantidad de restos Fc libres que pueden estar presentes como impurezas.

60 Por tanto, la invención se refiere a un método para reducir la concentración de restos Fc libres en un líquido que comprende una proteína que contiene Fc, comprendiendo el método someter dicho fluido a cromatografía de intercambio catiónico.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de cromatografía de intercambio catiónico para la reducción de Fc libres en una preparación de proteína que contiene Fc.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una proteína que contiene Fc purificado, que comprende menos del 5 % de restos Fc libres.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La figura 1 muestra un gel PAGE-SDS no reducido teñido con plata de diferentes fracciones derivadas de la cromatografía de intercambio catiónico descrita en el ejemplo 2. Pocillo 1: marcadores de peso molecular, pocillo 2: TACI-Fc purificada, pocillo 3: carga, pocillo 4: lavado 2, pocillo 5: eluido 2, pocillo 6: lavado 3; pocillo 7: eluido 3, pocillo 8: lavado 1, pocillo 9: eluido 1, pocillo 10: Fc libre purificado;

10 La figura 2 muestra el perfil cromatográfico de la cromatografía de intercambio catiónico descrito en el ejemplo 2.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

15 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia huella genética de cisteína (pseudorrepetición rica en cisteína) común a los miembros de la superfamilia del TNFR;

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de longitud completa del receptor TACI humano (p. ej., descrita en el documento WO 98/39361);

20 La SEQ ID NO: 3 es un ejemplo de una secuencia Fc humana (descrita en el documento WO 02/094852);

La SEQ ID NO: 4 es una proteína de fusión Fc que comprende secuencias derivadas de la porción extracelular de TACI y una porción Fc de la IgG₁ humana (descrita en el documento WO 02/094852);

25 La SEQ ID NO: 5 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2;

La SEQ ID NO: 6 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 3;

30 La SEQ ID NO: 7 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La presente invención se basa en el hallazgo de que la cromatografía de intercambio catiónico puede reducir la cantidad o el grado de restos Fc libres que pueden estar presentes en un líquido o composición de una proteína que contiene Fc.

40 Por tanto, la invención se refiere a un método para reducir la concentración de restos Fc libres en un líquido que comprende una proteína que contiene Fc, comprendiendo el método someter dicho fluido a cromatografía de intercambio catiónico.

45 El líquido que comprende la proteína que contiene Fc puede ser cualquier composición o preparación, como por ejemplo, un líquido corporal de un ser humano o animal, o un líquido derivado de un cultivo celular, como por ejemplo, el sobrenadante de un cultivo celular. También puede ser un líquido derivado de otro paso de purificación, como por ejemplo, el eluido o material no retenido de un paso de captura o cualquier otro paso de purificación adecuado como los que se explican con más detalle a continuación.

50 El término «proteína que contiene Fc», según se usa en este documento, se refiere a cualquier proteína que tiene al menos un dominio constante de inmunoglobulina seleccionado entre el dominio CH1, bisagra, CH2, CH3, CH4 o cualquiera de sus combinaciones, y preferiblemente un dominio bisagra, CH2 y CH3. El dominio constante de la inmunoglobulina puede derivarse de cualquier de entre IgG, IgA, IgE, IgM y sus combinaciones o isotipos. Preferiblemente, es IgG, como por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. Más preferiblemente es IgG₁.

55 Por tanto, una proteína que contiene Fc, según el presente método, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de fusión Fc, o sus variantes, como fragmentos, mutéínas o derivados funcionales de anticuerpos o proteínas de fusión Fc. La proteína que contiene Fc puede ser un monómero, dímero o multímero. La proteína que contiene Fc puede también ser un «pseudodímero» (denominado en ocasiones «monómero») que contiene un resto Fc dimérico (p. ej., un dímero de dos construcciones bisagra-CH2-CH3 unidos mediante dos puentes disulfuro), de los cuales solo uno se fusiona con otro resto como un dominio variable de inmunoglobulina, un fragmento de unión al ligando y opcionalmente, inhibidor del receptor, o cualquier otra proteína. Un ejemplo de este pseudodímero es una proteína de fusión Fc con interferón-β fusionado con una de las dos construcciones de bisagra-CH2-CH3 de IgG como, por ejemplo, la descrita en el documento WO 2005/001025.

La proteína que contiene Fc también puede ser un heterodímero que contiene dos porciones no inmunoglobulina diferentes o dominios variables de inmunoglobulina, o un homodímero que contiene dos copias de una porción no inmunoglobulina o dominio variable de inmunoglobulina.

5 En una realización, la proteína que contiene Fc es un dímero o un homodímero.

El resto Fc también puede modificarse para modular sus funciones efectoras.

10 Por ejemplo, si el resto Fc deriva de IgG₁, pueden introducirse las siguientes mutaciones de Fc, según las posiciones del índice EU (Kabat y cols., 1991):

T250Q/M428L
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F
E233P/L234V/L235A/ΔG236 + A327G/A330S/P331S
15 E333A; K322A.

Pueden ser mutaciones de Fc adicionales, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones del índice EU seleccionadas entre 330, 331, 234 o 235, o sus combinaciones. También puede introducirse una sustitución de aminoácido en la posición 297 del índice EU localizada en el dominio CH2 en el resto Fc en el contexto de la presente invención, eliminando un posible sitio de unión de hidratos de carbono unidos a N. Adicionalmente, el resto de cisteína en la posición 220 del índice EU también puede sustituirse por un resto de serina, eliminando el resto de cisteína que normalmente forma enlaces disulfuro con la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina.

20 Se prefiere que el resto Fc comprenda o conste de la SEQ ID NO: 3 o esté codificado por un polinucleótido que comprenda o conste de la SEQ ID NO: 6.

En una realización preferida, la proteína que contiene Fc comprende una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, uno o más dominios variables de la cadena pesada y/o uno o más dominios variables de la cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo contiene uno o dos dominios variables de la cadena pesada. Más preferiblemente, el anticuerpo contiene adicionalmente uno o dos dominios constantes y/o variables de la cadena ligera.

30 Se prefiere que la proteína que contiene Fc sea un anticuerpo.

El término «anticuerpo» se refiere a una inmunoglobulina o fragmento de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno. El término incluye, pero sin limitaciones, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, quiméricos, de cadena sencilla, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados o generados *in vitro*. El anticuerpo puede seleccionarse a partir de cualquiera de los isotipos de anticuerpo conocidos, por ejemplo, IgA, IgG, IgD, IgE o IgM. El anticuerpo puede ser un monómero, dímero o multímero como un trímero o pentámero.

40 Son ejemplos de anticuerpos que pueden purificarse según la presente invención abciximab, rituximab, basiliximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, cetuximab, efalizumab, ibritumomab, bevacizumab u omalizumab. Son ejemplos adicionales de anticuerpos que pueden someterse a cromatografía de intercambio catiónico según la presente invención los anticuerpos dirigidos frente a:

45 CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80, CD86, CD147, CD164, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-12, subunidades del receptor de IL-18 (IL-18R-alfa, IL-18R-beta), TACI, BCMA, BAFF-R, receptor de EGF, receptor de VEGF, integrina $\alpha 4\beta 7$, integrina VLA4, integrinas B2, receptores TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando de RANK, molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), CTLA4, receptor de Fc-gamma-I, II o III, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR o L-selectina.

50 Los anticuerpos dirigidos frente a TNF, Blys o interferón- γ son ejemplos adicionales de anticuerpos de interés terapéutico.

55 Las proteínas de fusión Fc también son proteínas que contienen Fc que preferiblemente se someten al método de la invención.

60 El término «proteína de fusión Fc», según se usa en este documento, pretende abarcar proteínas, en particular proteínas terapéuticas, que comprenden un resto derivado de inmunoglobulina, que se denominará en este documento el «resto Fc», y un resto derivado de una segunda proteína no inmunoglobulina, que se denominará en este documento «resto terapéutico», independientemente de si se pretende o no el tratamiento de la enfermedad.

Las proteínas de fusión Fc terapéuticas, es decir, las proteínas de fusión Fc destinadas al tratamiento o prevención de enfermedades de un animal o, preferiblemente, para el tratamiento y administración a un ser humano, son especialmente adecuadas para su purificación según el presente método.

5 Cualquier proteína de fusión Fc puede purificarse según la presente invención, como por ejemplo, una proteína de fusión que contiene interferón- β . Preferiblemente, el método de la invención es para la purificación de una proteína de fusión Fc que comprende un fragmento de unión a ligando, como todo o parte de un dominio extracelular, de un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR).

10 El resto terapéutico de una proteína de fusión Fc puede, por ejemplo, ser o derivar de EPO, TPO, hormona del crecimiento, interferón alfa, interferón beta, interferón gama, PDGF-beta, VEGF, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, proteína de unión a IL-18, TGF-beta, TNF-alfa o TNF-beta.

15 El resto terapéutico de una proteína de fusión Fc puede también derivar de un receptor, por ejemplo, un receptor transmembrana, que preferiblemente es o deriva del dominio extracelular de un receptor, y, en particular, un fragmento de unión a ligando de la parte o dominio extracelular de un receptor determinado. Son ejemplos de receptores terapéuticamente interesantes CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80, CD86, CD147, CD164, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor IL-12, subunidades del receptor de IL-18 (IL-18R-alfa, IL-18R-beta), receptor de EGF, receptor de VEGF, integrina alfa 4
20 10 beta 7, integrina VLA4, integrinas B2, receptores TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando de RANK, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), CTLA4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor de Fc-gamma-I, II o III, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR o L-selectina.

25 Es muy preferido que el resto terapéutico derive de un receptor perteneciente a la superfamilia del TNFR. El resto terapéutico puede derivar, por ejemplo, del dominio extracelular de TNFR1 (p55), TNFR2 (p75), OX40, osteoprotegerina, CD27, CD30, CD40, RANK, DR3, ligando Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TAIL-R4, NGFR, AITR, BAFFR, BCMA, TACI.

30 El resto terapéutico derivado de un miembro de la superfamilia del TNFR comprende o consta preferiblemente de todo o parte del dominio extracelular del miembro del TNFR, y más preferiblemente comprende un fragmento de unión a ligando de dicho miembro del TNFR.

35 En la tabla 5 a continuación se enumeran los miembros de la superfamilia del TNFR a partir de los cuales puede derivarse de un resto terapéutico según la presente invención y sus respectivos ligandos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un «fragmento de unión a ligando» de un miembro de la familia del TNFR, por ejemplo en un sencillo ensayo *in vitro* en el que se mide la unión entre el fragmento de proteína de un receptor determinado y el ligando correspondiente. Este ensayo puede ser, por ejemplo, un sencillo ensayo tipo sándwich de tipo RIA o ELISA *in vitro*, en el que una de las proteínas, por ejemplo, el fragmento receptor, se inmoviliza a un portador (p. ej., una placa de ELISA) y se incuba, tras el bloqueo apropiado de los sitios de unión a proteínas del vehículo, con la segunda
40 proteína, por ejemplo, el ligando. Tras la incubación, la unión al ligando se detecta, por ejemplo, mediante marcaje radiactivo del ligando y determinación de la radiactividad unida, tras el lavado apropiado en un contador de centelleo. La unión al ligando también puede determinarse con un anticuerpo marcado, o un primer anticuerpo específico de ligando y un segundo anticuerpo marcado dirigido frente a la parte constante del primer anticuerpo. Por tanto, el ligando de unión puede determinarse fácilmente, dependiendo del marcador utilizado, por ejemplo, en una reacción
45 colorimétrica.

50 Preferiblemente, el método de la presente invención se utiliza para purificar una proteína de fusión Fc que comprende un resto terapéutico derivado de un miembro de la superfamilia del TNFR seleccionado entre los enumerados en la tabla 5.

Tabla 5: Superfamilia del TNFR (según Locksley y cols., 2001 y Bossen y cols., 2006)

Miembro de la superfamilia del TNFR	Ligando
NGFR	NGF
EDAR	EDA-A1
XEDAR	EDA-A2
CD40	CD40L
Fas	FasL
Ox40	OX40L
AITR	AITRL
GITR	GITRL
CD30	CD30L
CD40	CD40L
HveA	LIGHT, LT-alfa

Miembro de la superfamilia del TNFR	Ligando
4-1BB	4-1BBL
TNFR2	TNF-alfa, LT-alfa, LT-alfa-beta
LT-betaR	LIGHT, LT-alfa, LT-alfa-beta
DR3	TL1A
CD27	CD27L
TNFR1	TNF-alfa, LT-alfa, LT-alfa-beta
LTBR	LT-beta
RANK	RANKL
TACI	BlyS, APRIL
BCMA	BlyS, APRIL
BAFF-R	BAFF (= BlyS)
TRAILR1	TRAIL
TRAILR2	TRAIL
TRAILR3	TRAIL
TRAILR4	TRAIL
Fn14	TWEAK
OPG	RANKL, TRAIL
DR4	TRAIL
DR5	TRAIL
DcR1	TRAIL
DcR2	TRAIL
DcR3	FasL, LIGHT, TL1A

En una realización preferida, la proteína de fusión Fc comprende un resto terapéutico seleccionado entre un dominio extracelular de TNFR1, TNFR2 o su fragmento de unión a TNF.

- 5 En una realización preferida adicional, la proteína de fusión Fc comprende un resto terapéutico seleccionado entre un dominio extracelular de BAFF-R, BCMA o TACI o su fragmento de unión a al menos uno de Blys o APRIL.

Un ensayo para comprobar la capacidad de unión a Blys o APRIL se describe por ejemplo en Hymowitz y cols., 2006.

- 10 Aún en otra realización preferida, el resto terapéutico de una proteína de fusión Fc comprende la pseudorrepetición rica en cisteína de la SEQ ID NO: 1.

Es adicionalmente preferido que el resto terapéutico derive de TACI. TACI es preferiblemente TACI humano. La SEQ ID NO: 2 que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de un receptor TACI humano de longitud completa (SwissProt entrada O14836). Más preferiblemente, el resto terapéutico comprende una porción soluble de TACI, preferiblemente derivado del dominio extracelular de TACI. Preferiblemente, el resto terapéutico derivado de TACI comprende al menos los aminoácidos 33 a 67 de la SEQ ID NO: 2 y/o los aminoácidos 70 a 104 de la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, el dominio extracelular de TACI incluido en el resto terapéutico según la invención comprende o consta de los aminoácidos 1 a 166 de la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 30 a 166 de la SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 30 a 119 de la SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 2. Todos estos restos terapéuticos son los preferidos para la preparación de la proteína de fusión Fc que se purificará mediante el método según se describe en este documento y se combinan con los restos Fc descritos en detalle anteriormente, y en especial, con un resto Fc que comprende o consta de la SEQ ID NO: 3. Una proteína de fusión Fc preferida para su purificación según la presente invención comprende o consta de la SEQ ID NO: 4 que está codificada por el polinucleótido de la SEQ ID NO: 7.

Por tanto, es muy preferido que la proteína de fusión Fc comprenda un polipéptido seleccionado entre

- 30 a. aminoácidos 34 a 66 de la SEQ ID NO: 2;
 b. aminoácidos 71 a 104 de la SEQ ID NO: 2;
 c. aminoácidos 34 a 104 de la SEQ ID NO: 2;
 d. aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 2;
 e. SEQ ID NO: 3;
 f. SEQ ID NO: 4;
 35 g. un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida con el complemento de SEQ ID NO: 5 o 6 o 7 en condiciones muy rigurosas; y
 h. una muteína de cualquiera de entre (c), (d), (e) o (f) que tienen al menos el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de (c), (d), (e) o (f);

donde el polipéptido se une a al menos Blys o APRIL.

- 40 Según el presente método, la proteína que contiene Fc se somete a cromatografía de intercambio catiónico para reducir, disminuir o eliminar los restos Fc libres.

El término «restos Fc libres», «resto Fc libre» o simplemente «Fc libre», según se usa en este documento, pretende abarcar cualquier parte de la proteína que contienen Fc que se purificará según la presente invención, que deriva del dominio o dominios constantes de la inmunoglobulina sin que comprenda dominios completos adicionales. Por tanto, si la proteína que contiene Fc comprende dominios variables de inmunoglobulina, los Fc libres no contienen porciones significativas de los dominios variables. Si la proteína que contiene Fc es una proteína de fusión Fc, los Fc libres no contienen porciones significativas del resto terapéutico de la proteína de fusión Fc. Los Fc libres, por ejemplo, pueden contener dímeros de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG, que no están ligados o unidos a porciones significativas de un resto terapéutico o dominios variables de inmunoglobulina, como por ejemplo, la parte Fc que se genera mediante escisión con papaína. Una «porción significativa» puede ser, por ejemplo, no menos del 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % del dominio variable de longitud completa o del resto terapéutico presente en la proteína que contiene Fc.

Los monómeros derivados del resto Fc también pueden estar contenidos en la fracción Fc libre. Se entiende que el Fc libre puede seguir conteniendo un número de restos de aminoácidos del resto terapéutico o de los dominios variables de Ig, como por ejemplo, de uno a quince o uno a veinte, o uno a diez, o uno a cinco aminoácidos, o uno o dos únicos aminoácidos, que pertenecen al resto terapéutico o el dominio variable, que sigue fusionado al resto Fc.

La cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse en cualquier resina de intercambio catiónico adecuada, como por ejemplo, intercambiadores catiónicos débiles o fuertes como se explicó anteriormente en los antecedentes de la invención.

Preferiblemente, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en una resina de intercambio catiónico fuerte. Más preferiblemente, el material de intercambio catiónico comprende un metacrilato entrecruzado modificado con grupos SO_3^- . La columna que se comercializa con el nombre de Fractogel[®] EMD SO_3^- es un ejemplo de resina de intercambio catiónico que es especialmente adecuada en el contexto de la presente invención.

Preferiblemente, el líquido o composición que comprende la proteína que contiene Fc se carga en una resina de intercambio catiónico a un pH de al menos una unidad por debajo del punto isoeléctrico (pI) de dicha proteína de fusión Fc.

En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico se lava con un tampón con una conductividad de 8,2 a 8,6 mS/cm y a un pH de 5,5 a 7,5.

El paso de lavado se lleva a cabo preferiblemente a un pH que oscila de 6,0 a 7,0.

En una realización preferida adicional, el paso de lavado se lleva a cabo en un tampón que comprende fosfato sódico de 75 a 125 mM.

En una realización preferida adicional, la columna de intercambio catiónico se eluye a un pH que oscila de 7,0 a 8,5.

La elución puede llevarse a cabo preferiblemente a una conductividad que oscila de 15 a 22 mS/cm. Por ejemplo, puede seleccionarse la conductividad entre 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 mS/cm. Un tampón preferido para la elución es un tampón fosfato.

Según el presente método, puede usarse preferiblemente una cromatografía de intercambio catiónico para la eliminación o reducción de los Fc libres en el rango de 5 a 15 veces. Por tanto, puede conseguirse una reducción de la concentración de Fc libre en un líquido, preparación o composición que comprende una proteína que contiene Fc a menos del 20 %, o menos del 15 %, o menos del 10 %, o menos del 5 %, o menos del 2 %, o menos del 1 %, o menos del 0,8 %, o menos del 0,5 %, o menos del 0,3 %, o menos del 0,2 %, o menos del 0,1 % de la concentración de proteína total.

En una realización preferida, la cromatografía de intercambio catiónico puede utilizarse en un método de purificación con uno o más pasos adicionales seleccionados preferiblemente entre cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía en hidroxipatita.

Una proteína que contiene Fc preferida que se purificará según el presente método es una proteína de fusión que tiene un resto terapéutico derivado de TACI humano (SEQ ID NO: 2) y, en particular, un fragmento derivado de su dominio extracelular (aminoácidos 1 a 165 de la SEQ ID NO: 2). Un fragmento preferido comprende los aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 2. A partir de aquí, los restos terapéuticos derivados del dominio extracelular de TACI se denominarán «TACI soluble» o «TACIs». Un resto Fc preferido comprende la SEQ ID NO: 3, que da lugar a una proteína de fusión Fc según la SEQ ID NO: 4, denominada a partir de aquí «TACI-Fc». El término TACI-Fc, según se usa en este documento, también abarca muteínas de TACI-Fc.

El término «muteínas», según se usa en este documento, se refiere a análogos de TACIs o TACI-Fc, en los que uno o más restos de aminoácidos de TACIs o TACI-Fc se sustituyen por diferentes restos de aminoácidos, o se eliminan,

o se añaden uno o más restos de aminoácidos a la secuencia original de TACIs o TACI-Fc sin que cambie considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con los TACIs o TACI-Fc originales. Estas muteínas se preparan mediante técnicas de síntesis y/o mutagénesis dirigida a sitio, o mediante cualquier otra técnica adecuada conocida para ello.

5 Las muteínas según el presente método incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, como ADN o ARN, que hibrida con el complemento de un ADN o ARN, que codifica un TACIs o TACI-Fc según cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 4 en condiciones rigurosas. Un ejemplo de una secuencia de ADN que codifica un TACI-Fc es la SEC ID N. 7. El término «condiciones rigurosas» se refiere a las condiciones de hibridación y, posteriormente, de lavado, que los
10 expertos en la materia convencionalmente denominan «rigurosas». Véase Ausubel y cols., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitaciones, entre los ejemplos de condiciones rigurosas se incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio en, por ejemplo, SSC 2× y SDS al 0,5 % durante 5 minutos, SSC 2× y SDS al 0,1 % durante 15 minutos; SSC 0,1× y SDS al 0,5 % a 37 °C durante 30-60 minutos y, a continuación, SSC 0,1× y SDS al 0,5 % a 68 °C durante 30-
15 60 minutos. Los expertos en esta materia entienden que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas de oligonucleótidos (como 10-40 bases) o de las mezclas de sondas de oligonucleótidos. Si se utilizan mezclas de sondas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, *supra*.

20 En otra realización, cualquiera de dichas muteínas tiene al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y al menos el 95 %, de identidad u homología con las mismas.

25 La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinadas mediante comparación de las secuencias. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido entre las dos secuencias de dos polinucleótidos o dos polipéptidos, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando.

30 En el caso de secuencias en las que no existe una correspondencia exacta, puede determinarse un «porcentaje de identidad». En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para obtener una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar «huecos» en una o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. El porcentaje de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa de cada una de las secuencias que se están comparando (lo que se denomina alineamiento global), que es especialmente adecuado para las secuencias de una longitud igual o muy similar, o sobre longitudes definidas más cortas (lo que se denomina
35 alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el Paquete Wisconsin versión 9.1 de análisis de secuencia (Devereux J y cols., 1984), por ejemplo, pueden usarse los programas BESTFIT y GAP para determinar el porcentaje de identidad
40 entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de «homología local» de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo la familia BLAST de programas (Altschul S F y cols., 1990, Altschul S F y cols., 1997, accesible a través de la página web del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990).
45

Cualquiera muteína de este tipo preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativas de dichos TACIs o TACI-Fc, de modo que tiene una actividad de unión a ligando sustancialmente similar como una proteína de SEQ ID NO: 2 o 4. Por ejemplo, una actividad de TACI es su capacidad de unión a Blys o APRIL (Hymowitz y cols., 2006). Siempre que la muteína tenga actividad de unión a APRIL o Blys sustancial, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar al TACI. Por tanto, un experto en la materia puede determinar con facilidad si cualquier muteína en concreto tiene sustancialmente la misma actividad que una proteína de SEQ ID NO: 2 o 4 mediante experimentación rutinaria.
50

55 En otra realización preferida, cualquiera de dichas muteínas tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y al menos el 95 %, de identidad u homología con las mismas.

Los cambios preferidos para las muteínas según la presente invención son las conocidas como sustituciones «conservadoras». Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de TACIs o TACI-Fc, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de modo que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos puedan también hacerse en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, especialmente si las inserciones o deleciones afectan solo a algunos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, menos de veinte, o preferiblemente menos de diez y no se eliminan o desplazan aminoácidos críticos
60

para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas mediante estas deleciones y/o inserciones están dentro del alcance del presente método.

5 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos conservadores son los que se definen en la tabla 2. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la tabla 3; y más preferiblemente los aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la tabla 4.

TABLA 2

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

TABLA 3

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

TABLA 4

60	Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos	
	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser
	Arg	Arg
	Leu	Leu, Ile, Met
65	Pro	Pro

	Thr	Thr
	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
5	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe	Phe
	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
10	Gln	Gln
	Asn	Asn
	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
15	Met	Met, Ile, Leu
	Trp	Met

Puede prepararse un derivado funcional a partir de una proteína de fusión Fc purificada según la presente invención. «Derivados funcionales» según se usa en este documento abarca los derivados de la proteína que contiene Fc que se purifican según la presente invención, y que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales de los restos o grupos N o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención siempre que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la proteína que contiene Fc sin modificar como se define anteriormente, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que las contienen.

Los derivados funcionales de una proteína que contiene Fc pueden, por ejemplo, conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, como su estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano o inmunogenicidad. Para alcanzar este objetivo, la proteína que contiene Fc puede unirse, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo por medios conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

Los derivados funcionales también pueden, por ejemplo, incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante la reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los restos de aminoácidos formados con restos acilo (p. ej., grupos alcanilo o aroilo carbocíclicos) o derivados O-acilo de los grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una proteína purificada mediante el proceso de purificación según la invención. A partir de aquí, esta proteína también se denomina «proteína que contiene Fc purificada».

Dicha proteína que contiene Fc purificada es preferiblemente una proteína que contiene Fc altamente purificada. La proteína de fusión Fc altamente purificada se determina, por ejemplo, mediante la presencia de una única banda en un gel PAGE-SDS no reducido teñido con plata tras cargar la proteína a una cantidad de 2 µg por pocillo. La proteína de fusión Fc purificada también puede definirse como una elución en un único pico en HPLC.

La preparación de la proteína que contiene Fc obtenida a partir del proceso de purificación de la invención puede contener menos del 20 % de impurezas, preferiblemente menos del 10 %, 5 %, 3 %, 2 % o 1 % de impurezas, o puede estar purificada a homogeneidad, es decir, estar libre de cualquier contaminante proteico detectable según se determina mediante PAGE-SDS teñido con plata o HPLC, como se explicó anteriormente.

La presente invención además se relaciona con el uso de cromatografía de intercambio catiónico para la reducción de la concentración de restos Fc libres en una composición que comprende una proteína que contiene Fc.

En una realización preferida, la concentración de Fc libre se reduce a menos del 5 % de la concentración de proteína total de dicha composición.

EJEMPLOS: PURIFICACIÓN DE TACI-Fc HUMANO RECOMBINANTE A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE CÉLULAS CHO SIN SUERO

Glosario utilizado en todos los ejemplos

VL:	volumen de lecho
CHO:	ovario de hámster chino
PA:	proceso anterógrado
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético

	ELISA:	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
	CHA:	cromatografía en hidroxapatita
	PCH:	proteína de la célula huésped
5	HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
	di:	diámetro interno
	K:	potasio
	kD:	kilo Dalton
	MES:	ácido 2-morfolinoetanosulfónico
10	Na:	sodio
	AcNa:	acetato sódico
	n/d:	no determinado
	PA-SE-HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular en proteína A
	ppm:	partes por millón
15	OI:	ósmosis inversa
	TA:	temperatura ambiente
	PAGE-SDS:	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
	SE-HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular
	T °C:	Temperatura
20	TMAC:	cloruro de tetrametilamonio
	UV:	ultravioleta
	API:	agua para inyección
	AOI:	agua de ósmosis inversa

Ejemplo 1: Paso de captura: Purificación por afinidad en proteína A

25 El material de partida era el medio recogido aclarado de un clon de células CHO que expresaba TACI-Fc cultivado en condiciones sin suero y conservado congelado hasta su uso.

30 El paso de captura en una columna MabSelect Xtra™ (GE Healthcare 17-5269-03) se llevó a cabo según el siguiente protocolo, en una columna que tenía una altura de lecho de 17 cm. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto la solución de carga, que se mantuvo a una temperatura inferior a 15 °C. Se registró la señal UV a 280 nm.

Desinfección

35 La columna se desinfectó con al menos 3 VL de ácido acético 0,1 M + etanol al 20 % en flujo inverso a 250 cm/h. El flujo se detuvo durante 1 hora.

Paso de lavado

40 La columna se lavó con al menos 2 VL de agua de OI en flujo inverso a 250 cm/h.

Equilibrado

45 La columna se equilibró con al menos 5 VL de fosfato sódico 25 mM + NaCl 150 mM pH 7,0 (hasta que los parámetros de conductividad y el pH estén dentro del rango especificado: pH $7,0 \pm 0,1$; conductividad 18 ± 2 mS/cm) en flujo descendente a 450 cm/h.

Carga

50 La columna se cargó con el material recogido aclarado conservado a una temperatura inferior a 15 °C hasta una capacidad de un máximo de 15 mg totales de TACI-Fc según se determinó mediante ensayo Biacore por ml de resina empaquetada a un caudal de 350 cm/h.

Paso de lavado

55 La columna se lavó con al menos 2 VL de tampón de equilibrado a 350 cm/h, a continuación, con al menos 4 VL de tampón de equilibrado (hasta que la señal UV recuperaba el valor basal) a 450 cm/h.

Elución

60 El material se eluyó con diferentes tampones de elución como se muestra en la tabla I a un caudal de 350 cm/h. La fracción eluida se recogió desde el inicio del aumento de la señal UV hasta $6,0 \pm 0,5$ VL de elución. El eluido se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente a pH inferior a 4,1 (ajustado mediante la adición de solución de ácido cítrico, si era necesario) y, a continuación, el pH se ajustó a $5,0 \pm 0,1$ mediante la adición de una solución de NaOH al 32 %.

Regeneración

5 La columna se regeneró con al menos 3 VL de NaOH 50 mM + NaCl 1 M en flujo inverso a 450 cm/h, se detuvo el flujo durante 15 min, a continuación, el flujo se reinició a 450 cm/h durante al menos 3 VL (hasta que la señal UV recuperaba el valor basal).

A partir de este paso, la columna funcionó en modo de flujo inverso.

Paso de lavado

10 La columna se lavó con al menos 2 VL de agua de OI a 450 cm/h.

Desinfección

15 La columna se desinfectó con al menos 3 VL de tampón de desinfección a 250 cm/h, el flujo se detuvo y la columna se incubó durante 60 min.

Pasos de lavado finales

20 La columna se lavó con al menos 1 VL de agua de OI a 250 cm/h, a continuación con al menos 3 VL de tampón de equilibrado a 250 cm/h y, finalmente, con al menos 2 VL de agua OI a 250 cm/h. Finalmente, se conservó la columna tras lavarla con al menos 3 VL de etanol al 20 % a 250 cm/h.

Resultados

25 **Tabla I:** Resultados utilizando diferentes tampones de elución

Nº de experimento	Tampón de elución	Rendimiento de TACI-Fc (%)	Agregados (%)	PCH (ppm)
1	AcNa 50 mM pH 3,7	47,7	30,3	5558
2	AcNa 100 mM pH 3,8	55,7	25,2	n/d
3	AcNa 200 mM pH 3,8	58,0	28,2	n/d
4	AcNa 100 mM pH 3,7	68	30,0	n/d
5	AcNa 0,2 M + NaCl 150 mM pH 4	75,1	3,8	n/d
6	AcNa 100 mM pH 3,7	84,6	22	3491
7	AcNa 250 mM pH 3,7	82,8	18,7	3318
8	Citrato Na 100 mM pH 3,7	79,2	8,8	4710
9	Citrato Na 250 mM pH 3,7	71,9	23	2347
10	Citrato Na 100 mM pH 3,75	82,8	8,5	1576
11	Citrato Na 100 mM pH 3,75	66,6	9,0	664
12	AcNa 100 mM pH 3,85	83,3	15,0	n/d
13	Citrato Na 100 mM pH 3,75	81,0	9,1	3490
14	Citrato Na 100 mM pH 3,65	75,1	14,6	2580
14	Citrato Na 100 mM pH 3,75	44,7	18,4	3783
16	Citrato Na 100 mM pH 3,75	47,1	15,8	3217
17	Citrato Na 100 mM pH 3,75	50,7	9,4	2349
18	Citrato Na 100 mM pH 3,75	58,0	10,4	2550
19	Citrato Na 100 mM pH 3,75	67,1	28,7	2372
20	Citrato Na 100 mM pH 3,75	65,6	17,5	2353
21	Citrato Na 100 mM pH 3,75	75,6	19,4	1807
22	Citrato Na 100 mM pH 3,75	57,1	20,7	2465
23	Citrato Na 100 mM pH 3,75	51,9	18,4	2030
24	Citrato Na 100 mM pH 3,75	58	11,5	1746
25	Citrato Na 100 mM pH 3,75	41,8	22,9	3029
26	Citrato Na 100 mM pH 3,9	39,4	6,0	2424
27	Citrato Na 100 mM pH 3,9	31,0	8,8	2936
28	AcNa 100 mM pH 4,1	28,3	25,0	3311
29	Citrato Na 100 mM pH 3,9	46,4	9,1	n/d
30	AcNa 100 mM pH 4,1	42,8	13,4	n/d
31	Citrato Na 100 mM pH 3,75	57,5	26,5	n/d
32	AcNa 100 mM pH 4,2	38,1	10,1	n/d
33	Citrato Na 100 mM pH 3,9	43,3	8,3	2011

Nº de experimento	Tampón de elución	Rendimiento de TACI-Fc (%)	Agregados (%)	PCH (ppm)
34	Citrato Na 100 mM pH 3,9	63,6	6,6	1749
35	Citrato Na 100 mM pH 3,9	65,7	7,3	1689
36	Citrato Na 100 mM pH 3,9	62,7	7,4	1609
37	Citrato Na 100 mM pH 3,9	61,6	7,4	1479
38	Citrato Na 100 mM pH 3,9	60,6	7,4	1623
39	Citrato Na 100 mM pH 3,9	64,6	8,0	1497

Conclusiones

5 La proteína TACI-Fc5 en el medio recogido aclarado se capturó directamente en una columna MabSelect Xtra con una capacidad dinámica de 15 g de TACI-Fc5 total por litro de resina empaquetada a un caudal de 350 cm/h. Las condiciones de elución, especialmente el pH, se optimizaron para maximizar la recuperación del producto mientras se proporcionaba una reducción significativa en los niveles agregados. Se seleccionó el tampón de elución citrato sódico 0,1 M pH 3,9 que proporcionaba niveles de agregados de aproximadamente 5-10 % empezando en aproximadamente 25-40 % en el medio recogido aclarado y sin que se observara turbidez. Los niveles de PCH típicamente eran de 1500 -2000 ppm. Los niveles de PCH se midieron mediante ELISA utilizando anticuerpos policlonales. La mezcla de anticuerpos se generó frente a proteínas de la célula huésped a partir del sobrenadante del medio de cultivo celular aclarado y concentrado de células CHO no transfectadas.

Ejemplo 2: Cromatografía de intercambio catiónico

15 El eluido del paso de captura en proteína A, dializado en el tampón de carga adecuado, se usó como material de partida para la cromatografía de intercambio catiónico.

20 En este paso se utilizó una columna Fractogel EMD SO₃⁻ (Merck 1.16882.0010) con una altura de lecho de 10 cm. También se puede utilizar una columna Fractogel SO₃⁻ con una altura de lecho de 15 cm. En este último caso, puede que sea necesario adaptar la capacidad dinámica y el caudal, lo que está dentro de conocimiento rutinario del experto en la materia.

25 Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y el caudal se mantuvo constante a 150 cm/h. Se registró la señal UV a 280 nm durante todo el tiempo.

Paso de lavado

30 La columna se lavó con al menos 1 VL de AOI (agua de ósmosis inversa).

Desinfección

A continuación, la columna se desinfectó con al menos 3 VL de NaOH 0,5 M + NaCl 1,5 M en modo flujo ascendente.

Aclarado

35 La columna se aclaró con al menos 4 VL de AOI en modo flujo descendente.

Equilibrado

40 La columna se equilibró con al menos 4 VL de citrato sódico 100 mM pH 5,0 (o hasta que se alcanzaban la conductividad deseada de 12 ± 1 mS/cm y un pH 5,0 ± 0,1).

Carga

45 La columna se cargó con material poscaptura a pH 5,0 (pH de 5,0±0,1, conductividad de 12±1mS/cm) y a una capacidad de no más de 50 mg de TACI-Fc, según se determinó mediante ensayo SE-HPLC por ml de resina empaquetada.

Paso de lavado

A continuación, se lavó la columna con al menos 5 VL de fosfato sódico 100 mM pH 6,5.

Elución

50 La columna se eluyó con diferentes tampones y en diferentes condiciones según se recoge en las tablas II a IV a continuación.

Regeneración y desinfección

55

La columna se regeneró y desinfectó con al menos 4 VL de NaOH 0,5 M + NaCl 1,5 M en modo flujo ascendente. A continuación, el flujo se detuvo durante 30 minutos.

Aclarado

5 La columna se aclaró con al menos 4 VL de AOI.

Conservación

10 La columna se conservó en al menos 3 VL de etanol al 20 %.

Resultados

15 **Tabla II:** Efecto del pH y de la conductividad de elución
Niveles de PCH en la carga: 189 ppm

pH	Conductividad (mS/cm)	Recuperación de TACI-Fc	PCH (ppm)	Aclaramiento de PCH (x)
6,5	15,0	25 %	118	1,6
7,3	22,5	100 %	50	3,8
8,0	15,0	95 %	34	5,5
7,3	22,5	100 %	56	3,4
7,3	33,0	98 %	133	1,4
7,3	22,5	96 %	45	4,2
7,3	22,5	97 %	53	3,6
7,3	12,0	54 %	79	2,4
6,3	22,5	83 %	47	4,1
8,0	30,0	96 %	108	1,8
8,2	22,5	97 %	46	4,2
6,5	30,0	91 %	116	1,6
7,3	22,5	93 %	48	3,9
7,3	22,5	95 %	40	4,8

20 En la tabla III se muestra la recuperación de TACI-Fc y el aclaramiento de PCH cuando se carga a una capacidad de 10 y 32 mg de TACI-Fc por ml de resina y se eluye con un tampón fosfato a una conductividad de entre 12 y 33 mS/cm. La recogida del pico se llevó a cabo desde el inicio del aumento del valor de UV durante $10 \pm 0,5$ VL.

Tabla III: Efecto del pH y de la conductividad de elución óptimos según la capacidad de carga
Niveles de PCH en la carga: 201 ppm

Capacidad de carga (mg/ml)	pH	Conductividad (mS/cm)	Recuperación de TACI-Fc	PCH (ppm)	Aclaramiento de PCH (x)
10	8,0	15,0	91 %	67	3,0
		20,7	93 %	61	3,3
32	8,0	20,7	88 %	54	3,7

25 En la tabla IV se muestra el efecto de un paso de lavado con fosfato sódico 50, 100 o 150 mM, pH 6,5 sobre la recuperación de TACI-Fc y el aclaramiento de las PCH.

30 **Tabla IV:** Efecto de las condiciones del paso de lavado sobre el rendimiento de la columna
Niveles de PCH en la carga: 190 ppm y niveles de agregados: 2,0 %

Concentración de fosfato sódico en el lavado (mM)	Rendimiento de TACI-Fc en el lavado	Rendimiento de TACI-Fc en el eluido	Agregados en el eluido	PCH en el eluido (ppm)	
lavado 1	50	0,7 %	99 %	2,8 %	62
lavado 2	100	2,1 %	98 %	2,9 %	59
lavado 3	150	9,1 %	90 %	2,7 %	49

El tampón utilizado en el lavado 2, que contenía fosfato sódico 100 mM, pH 6,5, tenía una conductividad de 8,4 mS/cm.

35 En la figura 1 se muestra un gel PAGE-SDS no reducido teñido con plata de muestras procedentes de experimentos usando las tres condiciones del paso de lavado que se muestran en la tabla IV sobre el aclaramiento de Fc libre.

En la figura 2 se muestran cromatogramas superpuesto de los experimentos del paso de lavado con fosfato sódico a concentraciones diferentes.

El paso de lavado se optimizó a pH 6,5 con concentraciones crecientes de fosfato sódico (de 50 a 150 mM). Como puede observarse en la figura 1, una concentración del tampón de lavado de 150 mM (lavado 3, pocillo 6) daba lugar a pérdida de TACI-Fc. Una concentración de tampón de lavado de 50 mM (lavado 1, pocillo 8) daba lugar a un pico de TACI-Fc pura, sin embargo, el eluido contenía trazas de Fc libre. Un paso de lavado con fosfato sódico 100 mM pH 6,5 daba lugar a la recuperación del 98 % en el pico de elución principal y una pérdida de tan solo el 2 % en el lavado (figura 2). El aclaramiento de PCH fue de 3,2 veces. El análisis de las fracciones de lavado y eluida mediante PAGE-SDS muestra que el paso de lavado contenía Fc libre con parte de TACI-Fc intacta a concentraciones de tampón de 100 mM o superiores (fig. 1, pocillos 4 y 6). Se necesita una concentración de 100 mM o superior para eliminar completamente el Fc libre de la fracción eluida (fig. 1, pocillos 5 y 7).

Conclusiones

Se desarrolló un paso de intercambio catiónico como segundo paso de purificación, tras el paso de captura. El eluido de captura se obtuvo a pH bajo (5,0) y baja conductividad y podía cargarse directamente en el intercambiador catiónico. Se seleccionó una resina Fractogel EMD SO₃⁻ con una capacidad de carga de 50 mg/ml. El producto de degradación no bioactivo de Fc libre podía eliminarse de manera eficaz en un paso de lavado con fosfato sódico 0,1 M pH 6,5. Las condiciones de elución se optimizaron para un mejor aclaramiento de las PCH y alta recuperación de TACI-Fc (fosfato sódico 179 mM, pH 8,0; conductividad 20,7 mS/cm).

Alternativamente, la elución puede llevarse a cabo en 10 VL de fosfato sódico 20 mM y NaCl 180 mM pH 8,0 desde el inicio del aclarado con la absorbancia a 280 nm.

Ejemplo 3: Cromatografía de intercambio aniónico

El material de partida utilizado para este paso de purificación fue el eluido del paso de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (véase el ejemplo 2), dializado o diluido en un tampón de carga adecuado.

Este paso de cromatografía de intercambio aniónico se llevó a cabo en una columna SOURCE 30Q (GE Healthcare 17-1275-01) con una altura de lecho de 10 cm. También puede utilizarse en este paso una columna SOURCE 30Q con una altura de lecho de 15 cm. En este último caso, puede que sea necesario adaptar la capacidad dinámica y el caudal, lo que está dentro de conocimiento rutinario del experto en la materia.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se registró la señal UV a 280 nm. Los pasos se llevaron a cabo a un caudal de 150 o 200 cm/h.

Aclarado

En primer lugar, la columna se aclaró con al menos 1 VL de agua de OI a un caudal de 150 cm/h.

Desinfección

A continuación, la columna se desinfectó con al menos 3 VL de NaOH 0,5 M + NaCl 1,5 M.

Paso de lavado

La columna se lavó con al menos 3 VL, preferiblemente de 4 a 10 VL, de fosfato Na 0,5 M, pH 7,5 a un caudal de 200 cm/h.

Equilibrado

La columna se equilibró con al menos 5 VL de fosfato sódico 10, 15, 20, 25 o 30 mM, pH 7,5. Opcionalmente, la columna puede equilibrarse previamente con 3 VL de fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5.

Carga, lavado y recogida concomitante de TACI-Fc en el material no retenido

La columna se cargó con material posterior al intercambio catiónico diluido para obtener una concentración de fosfato de 10 a 30 mM, pH 7,5, a una capacidad de no más de 50 mg de TACI-Fc según se determinó mediante ensayo SE-HPLC por ml de resina empaquetada, recogiendo el material no retenido desde el inicio del aumento del valor de UV hasta el final del paso de lavado, lo que se llevó a cabo con 4 ± 0,5 VL de tampón de equilibrado.

Regeneración/desinfección

La columna se regeneró y desinfectó con al menos 3 VL de NaOH 0,5 M + NaCl 1,5 M en modo de flujo inverso (hasta que la señal UV recuperaba el valor basal) a un caudal de 150 cm/h. Al final de la regeneración, la bomba se detuvo durante 30 min.

5 *Paso de lavado*

La columna se lavó con al menos 3 VL de agua de OI a un caudal de 200 cm/h.

Conservación

10 La columna se conservó en al menos 3 VL de etanol al 20 % (v/v) a un caudal de 150 cm/h.

Resultados

En la tabla V a continuación se resumen los resultados obtenidos con el proceso de purificación descrito anteriormente.

15

Tabla V: Efecto de la concentración de fosfato de carga

pH de carga	Conc. de fosfato de carga (mM)	Conc. de TACl-Fc de carga (mg/l)	Capacidad de carga (mg/ml)	Recuperación de TACl-Fc	Agregados	PCH (ppm)
7,5	30	773	39	94 %	10,4 %	82,8
7,5	25	639	39	90 %	6,9 %	50,4
7,5	20	651	49	90 %	5,6 %	43,9
7,5	15	437	46	88 %	3,4 %	45,0
7,5	10	283	n/d	82 %	2,8 %	26,3

Conclusiones

20

Se optimizó el paso de intercambio aniónico en una columna Source 30Q en modo material no retenido para maximizar el aclarado de PCH y de agregados. La carga del eluido del intercambio catiónico diluido o diafiltrado en tampón fosfato sódico 20 mM a pH 7,5 proporcionó el mejor equilibrio entre recuperación de producto (90 %) y aclaramiento de PCH (de aproximadamente 2000 ppm a 44 ppm) y agregados (de aproximadamente el 25 % al 5,6 %). Se usó una capacidad dinámica de 50 mg de TACl-Fc por ml de resina empaquetada a un caudal de 150-200 cm/h.

25

Ejemplo 4: Cromatografía en hidroxiapatita

30 El material de partida utilizado para este paso de purificación fue el material no retenido de la cromatografía de intercambio aniónico (véase el ejemplo 3).

Se utilizó una columna de 40 µm de hidroxiapatita cerámica de tipo I CHT (Biorad 157-0040) con una altura de lecho de 10 cm.

35

Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El caudal se mantuvo constante a 175 cm/h y se registró la señal UV a 280 nm. Todas las soluciones se esterilizaron mediante filtración y el equipo se desinfectó con hidróxido sódico antes de su uso. La columna se conservó en una solución de NaOH 0,5 M cuando no se usaba.

40 *Pasos iniciales de lavado (aclarado y preequilibrado)*

La columna se lavó con al menos 1 VL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 y, a continuación con al menos 3 VL de tampón fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5 para bajar el pH.

45 *Equilibrado*

La columna se equilibró con al menos 5 VL de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 (o hasta que se alcanzaban la conductividad deseada de $3,0 \pm 0,3$ mS/cm y un pH $7,5 \pm 0,1$).

Carga

50

La columna se cargó con material no retenido de SOURCE 30Q con cloruro de calcio añadido a una concentración final de 0,1 mM a partir de una solución madre a 0,5 M y pH ajustado a 7,0 mediante la adición de ácido ortofosfórico al 85 %, con una capacidad de TACl-Fc de 50 mg NMT según se determinó mediante el ensayo SE-HPLC por ml de resina empaquetada. También es posible cargar el material no retenido en SOURCE 30Q sin cloruro cálcico, ajustado a pH 7,0, en una columna de hidroxiapatita.

55

Pasos de lavado

La columna se lavó con al menos 4 VL de fosfato sódico 3, 4 o 5 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 0,1 mM pH 6,5. También es posible utilizar el mismo tampón sin cloruro de calcio.

Elución

5 La columna se eluyó con tampón fosfato sódico 5, 4, 3 o 2 mM (véase la tabla VI), MES 10 mM, CaCl₂ 0,1 mM y KCl 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 M pH 6,5 (véase la tabla VII) desde el inicio del aumento del valor de UV para diferentes VL (véanse las tablas VI y VII). También es posible utilizar el mismo tampón sin cloruro cálcico para la elución.

10 *Aclarado*

La columna se aclaró con:

- al menos 1 VL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5;
- al menos 3 VL de tampón fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5; y
- 15 - al menos 1 VL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5.

Conservación

La columna se conservó en al menos 3 VL de NaOH 0,5 M.

20

Resultados

En la tabla VI se muestra el efecto de la concentración de fosfato (de 2 a 5 mM) en el tampón de elución sobre el aclaramiento de agregados y la recuperación del producto. Las fracciones del pico de elución se mezclaron y se analizaron la concentración de TACI-Fc y los niveles de agregados mediante SE-HPLC.

25

Tabla VI: Efecto de la concentración de fosfato en el tampón de elución

Conc. de fosfato (mM)	VL de elución	Rendimiento de TACI-Fc	Agregados
5	12	73 %	0,49 %
	13	74 %	0,52 %
	14	68 %	0,65 %
	15	77 %	0,67 %
	16	77 %	0,70 %
	17	70 %	0,73 %
4	18	76 %	0,85 %
	12	68 %	0,34 %
	13	67 %	0,29 %
	14	66 %	0,36 %
	15	67 %	0,39 %
	16	66 %	0,38 %
3	17	66 %	0,32 %
	18	66 %	0,40 %
	12	70 %	0,46 %
	13	76 %	0,42 %
	14	73 %	0,51 %
	15	71 %	0,52 %
2	16	69 %	0,55 %
	17	69 %	0,50 %
	18	70 %	0,53 %
	12	65 %	0,19 %
	13	66 %	0,00 %
	14	66 %	0,18 %
	15	68 %	0,14 %
	16	66 %	0,17 %
	17	71 %	0,19 %
	18	65 %	0,16 %

30 En la tabla VII se muestra el efecto de la concentración de KCl en el tampón de elución sobre el aclaramiento de agregados y la recuperación del producto. Se estudiaron dos concentraciones de fosfato sódico: 2 y 3 mM. Las fracciones del pico de elución se mezclaron y se analizaron la concentración de TACI-Fc y los niveles de agregados mediante SE-HPLC.

35

Tabla VII: Efecto de la concentración de cloruro de potasio en el tampón de elución

Conc. de fosfato (mM)	Conc. de KCl (M)	VL de elución	Rendimiento de TACI-Fc	agregados
3	0,6	10	102 %	0,48 %
		11	109 %	0,46 %
		12	106 %	0,43 %
		13	105 %	0,42 %
		14	103 %	0,43 %
3	0,7	10	96 %	0,42 %
		11	97 %	0,40 %
		12	98 %	0,41 %
		13	96 %	0,40 %
		14	96 %	0,43 %
3	0,8	10	106 %	0,58 %
		11	110 %	0,55 %
		12	112 %	0,57 %
		13	101 %	0,59 %
		14	110 %	0,57 %
2	0,6	10	71 %	0,29 %
		11	79 %	0,28 %
		12	80 %	0,29 %
		13	80 %	0,29 %
		14	81 %	0,26 %
2	0,9	10	64 %	0,27 %
		11	72 %	0,25 %
		12	73 %	0,29 %
		13	70 %	0,33 %
		14	66 %	0,24 %

Conclusiones:

La cromatografía en hidroxapatita proporciona un modo fiable y eficaz de reducir los niveles de agregados TACI-Fc. Partiendo de material purificado mediante cromatografía de intercambio aniónico (véase el ejemplo 3) con niveles de agregados de aproximadamente 5-8 %, la cromatografía en hidroxapatita puede reducir estos niveles por debajo del 0,8 % con una recuperación de TACI-Fc del 85-90 %.

REFERENCIAS

1. Akerstrom and Bjork, J Biol Chem. 1989 nov 25;264(33):19740-6.
2. Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990
3. Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997
4. Armour KL. *et al.*, 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 29(8):2613-24
5. Bodmer et al., TIBS 27(1), 19-24
6. Boschetti, E., Jungbauer, Sep. Sci. & Tech. 2 No. 15, Acad. Press (2000) 53
7. Boschetti et al., Genetic Engineering Vol. 20, No. 13, julio, 2000
8. Bossen et al., JBC 281(2), 13964-13971
9. Bram and von Bülow, US 5,969,102 (1999)
10. Bram et al., WO 98/39361
11. Carter PJ., 2006. Potent antibody therapeutics by design. Nature Reviews Immunology. Adelanto de publicación online
12. Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984
13. Feng et al., Bioprocessing 2005, 1-7
14. Giovannini, Biotechnology and Bioengineering 73:522-529 (2000)
15. Grantham et al., Science, Vol. 185, pág. 862-864 (1974)
16. Gross et al., Nature 404(27), 995-999
17. Gross et al., WO 00/40716
18. Hinton PR. *et al.*, 2004. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. J Biol Chem. 279(8):6213-6
19. Hymowitz et al., JBC 280(8), 7218-7227
20. Idusogie EE. *et al.*, 2000. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J Immunol. 164(8):4178-84

21. Idusogie EE. *et al.*, 2001. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol.* 166(4):2571-5
22. Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD
- 5 23. Kochanek *et al.*, EP 1 230 354
24. Locksley *et al.*, *Cell* 104, 487-501, 2001
25. Melchers, *Ann. Rheum. Dis* 2003, 62, 25-27.
26. Moore *et al.*, *Science* 285: 260-3
27. Moreau *et al.*, *Blood* 103(8), 3148-3157
- 10 28. Naismith and Sprang, *TIBS* 23, 74-79, 1998
29. Novak *et al.*, *Blood* 103(2), 689-694
30. Parker *et al.*, WO 02/094852
31. Pearson, *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98
32. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, *Nature (London)* 258, 598-599 (1975)
- 15 33. Porath and B. Olin, *Biochemistry* 22, 1621-1630 (1983)
34. Puren *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2256-61
35. Shepard, J. *of Chromatography* 891:93- 98 (2000)
36. Shields RL. *et al.*, 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variantes with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604.
- 20 37. Smith *et al.*, WO 91/03553
38. Smith *et al.*, WO 94/06476
39. Stanker, J. *Immunological Methods* 76:157-169 (1985) (10 mM to 30 mM sodium phosphate elution gradient)
40. Steurer W. *et al.*, 1995. Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J Immunol.* 155(3):1165-74
- 25 41. Sun *et al.*, WO 2005/044856
42. Tarditi, J. *Chromatography* 599:13-20 (1992)
43. Vaccaro C. *et al.*, 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol.* 23(10):1283-8
- 30 44. Vigers *et al.*, *Nature.* 1997 mar 13;386(6621):190-4
45. Vedantham *et al.*, WO 03/59935
46. Vola *et al.*, *BioTechniques* 14:650-655 (1993)
47. von Bülow and Bram, *Science* 228: 138 (1997)
48. Xia *et al.*, *J. Exp. Med.* 2000, 137-143.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ares Trading S.A.
- 40 <120> Proceso para la purificación de proteínas que contienen fragmentos Fc
- <130> 1146 WO/PCT
- 45 <150> EP06119611.9
- <151> 2006-08-28
- <150> US60/842,542
- <151> 2006-09-06
- 50 <160> 7
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 55 <211> 40
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 60 <221> fuente
- <223> /nota=descripción de secuencia artificial: secuencia consenso, en la que los aminoácidos específicos en las posiciones 3, 12, 14, 15, 18, 21, 25, 34 y 38 están separados por cualquier variante
- 65 <220>

ES 2 755 386 T3

<221> variante

<222> (1)..(2), (4)..(11), 13, (16)..(17), (19)..(20), (22)..(24), (26)..(33), (35)..(37) y (39)..(40)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5 <400> 1

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Leu Leu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 35 40

10 <210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> homo sapiens

15 <400> 2

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

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

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

ES 2 755 386 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Gly Ala
290

ES 2 755 386 T3

<210> 3
<211> 251
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota=descripción de secuencia artificial: esta es una porción de una cadena pesada de inmunoglobulina humana

10

<400> 3

ES 2 755 386 T3

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

- 5 <210> 4
<211> 348
<212> PRT
<213> secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota=descripción de secuencia artificial: esta es la secuencia de una proteína de fusión que contiene una porción de un receptor TACI humano y una porción de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana.
- 15 <400> 4

ES 2 755 386 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 755 386 T3

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 210 215 220
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 225 230 235 240
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 245 250 255
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 260 265 270
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 275 280 285
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 290 295 300
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 305 310 315
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 325 330 335
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 5
 <211> 879
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<400> 5

10

ES 2 755 386 T3

atgagtggcc tgggccggag cagggcaggt ggccggagcc gtgtggacca ggaggagcgc 60
 tttccacagg gcctgtggac gggggtggct atgagatcct gccccgaaga gcagtactgg 120
 gatcctctgc tgggtacctg catgtcctgc aaaaccattt gcaaccatca gagccagcgc 180
 acctgtgcag ctttctgcag gtcactcagc tgccgcaagg agcaaggcaa gttctatgac 240
 catctcctga gggactgcat cagctgtgcc tccatctgtg gacagcacc taagcaatgt 300
 gcatacttct gtgagaacaa gctcaggagc ccagtgaacc ttccaccaga gctcaggaga 360
 cagcggagtg gagaagttga aaacaattca gacaactcgg gaaggtagca aggattggag 420
 cacagaggct cagaagcaag tccagctctc ccggggctga agctgagtgc agatcagggtg 480
 gccctggtct acagcacgct ggggctctgc ctgtgtgccg tcctctgctg cttcctgggtg 540
 gcggtggcct gcttcctcaa gaagaggggg gatccctgct cctgccagcc ccgctcaagg 600
 ccccgtaaaa gtccggccaa gtcttcccag gatcacgcga tggagccgg cagccctgtg 660
 agcacatccc ccgagccagt ggagacctgc agcttctgct tccctgagtg cagggcgccc 720
 acgcaggaga gcgcagtcac gcctgggacc cccgaccca cttgtgctgg aaggtaggggg 780

 tgccacacca ggaccacagt cctgcagcct tgcccacaca tcccagacag tggccttggc 840
 attgtgtgtg tgcctgcca ggaggggggc ccagggtgca 879

5

<210> 6
 <211> 753
 <212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=descripción de la secuencia artificial: ADN que codifica la SEQ ID No: 3

15

<400> 6

ES 2 755 386 T3

atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggtc ccagatgggt cctgtccgag 60
 cccaaatctt cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg 120
 gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 180
 cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 240
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 300
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 360
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc 420
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 480
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac 540
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 600
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 660
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 720
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 753

5 <210> 7
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la proteína de la SEQ ID No: 4

<400> 7
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggcgc cgtcttcggt 60
 tcgctcagcc aggaaatcca tgccgagttg agacgcttcc gtagagctat gagatcctgc 120
 cccgaagagc agtactggga tcctctgctg ggtacctgca tgcctgcaa aaccatttgc 180
 aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
 caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
 cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagcga gcccaaactt 360
 15 tcagacaaaa ctacacatg ccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 420

ES 2 755 386 T3

gtcttcctct	tcccccaaa	accaaggac	accctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	480
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	540
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	600
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	660
aagtgaagg	tctccaacaa	agccctccca	tcctccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	720
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	780
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	840
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtagctggac	900
tccgacggct	ccttcttct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	960
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	1020
agcctctccc	tgtctccggg	taaa				1044

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para reducir la concentración de restos Fc libres en un líquido que comprende una proteína que contiene Fc, comprendiendo el método someter a dicho líquido a cromatografía de intercambio catiónico en una resina de intercambio catiónico a un pH de al menos una unidad por debajo del punto isoeléctrico (pI) de dicha proteína que contiene Fc y lavar la resina de intercambio catiónico con un tampón con una conductividad de 8,2 a 8,6 mS/cm y un pH de 5,5 a 7,5.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que el paso de lavado se lleva a cabo a un pH de 6,0 a 7,0.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el paso de lavado se lleva a cabo en un tampón que comprende fosfato sódico de 75 a 125 mM.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende el paso de:
Eluir la proteína que contiene Fc a un pH que oscila de 7,0 a 8,5, en el que el paso de elución se lleva a cabo a una conductividad de 15 a 22 mS/cm.
- 20 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en una resina de intercambio catiónico que comprende grupos SO_3^- .
6. El método según la reivindicación 5, en el que la resina comprende una matriz de metacrilato entrecruzada.
- 25 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un paso de purificación seleccionado entre cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía en hidroxipatita.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína que contiene Fc comprende una región constante de inmunoglobulina (Ig).
- 30 9. El método según la reivindicación 8, en el que la región constante es una región constante humana.
10. El método según la reivindicación 8 o 9, en el que la inmunoglobulina es una IgG₁.
- 35 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la región constante comprende un dominio CH2 y un dominio CH3.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína que contiene Fc comprende una región variable de inmunoglobulina.
- 40 13. El método según la reivindicación 12, en el que la proteína que contiene Fc es un anticuerpo.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína que contiene Fc es una proteína de fusión Fc.
- 45 15. El método según la reivindicación 14, en el que la proteína de fusión Fc comprende una porción de unión al ligando de un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR).
- 50 16. El método según la reivindicación 15, en el que la porción de unión al ligando se selecciona entre un dominio extracelular de TNFR1, TNFR2 o un fragmento de los mismos de unión a TNF.
17. El método según la reivindicación 16, en el que la porción de unión al ligando se selecciona entre un dominio extracelular de BAFF-R, BCMA, TACI o un fragmento de los mismos de unión a al menos uno de entre Blys o APRIL.
- 55 18. El método según la reivindicación 17, en el que la proteína de fusión Fc comprende un polipéptido seleccionado entre
 - a. aminoácidos 34 a 66 de la SEQ ID NO: 2;
 - b. aminoácidos 71 a 104 de la SEQ ID NO: 2;
 - c. aminoácidos 34 a 104 de la SEQ ID NO: 2;
 - 60 d. aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 2;
 - e. SEQ ID NO: 3;
 - f. SEQ ID NO: 4;
 - g. un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida con el complemento de SEQ ID NO: 5 o 6 o 7 en condiciones muy rigurosas; y

- h. una muteína de cualquiera de (c), (d), (e) o (f) que tienen al menos el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de (c), (d), (e) o (f);
donde el polipéptido se une a al menos Blys o APRIL.
- 5 **19.** Uso de cromatografía de intercambio catiónico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para la reducción de la concentración de restos Fc libres en una composición que comprende una proteína que contiene Fc, en el que la concentración de Fc libre se reduce a menos del 5 % de la concentración de proteína total de dicha composición.

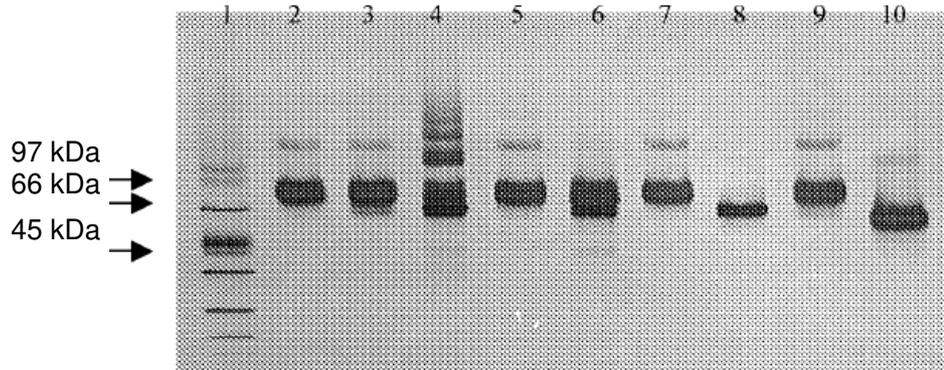


Fig. 1

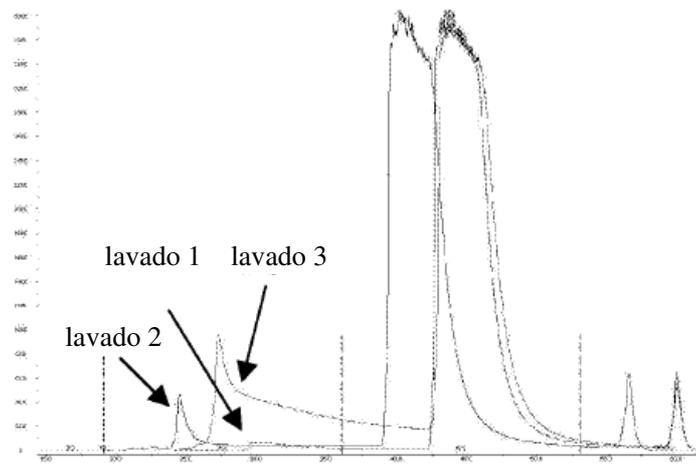


Fig. 2