

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 758**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/32** (2006.01)

**B01D 15/36** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/20** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2015 PCT/EP2015/000473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15131994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2015 E 15708730 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3113858**

54 Título: **Método de purificación de conjugados basados en IL-15/IL-15Ralfa**

30 Prioridad:

**03.03.2014 EP 14000742**

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

**24.02.2021**

73 Titular/es:

**CYTUNE PHARMA (100.0%)  
3 chemin Pressoir Chenaie  
44100 Nantes, FR**

72 Inventor/es:

**BECHARD, DAVID y  
DE MARTYNOFF, GUY**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 807 758 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

Método de purificación de conjugados basados en IL-15/IL-15Ralfa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la ingeniería bioquímica. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de recuperación bioquímico mejorado en el que conjugados basados en IL-15/IL-15Ralfa pueden replegarse y recuperarse en forma monomérica. Esta composición puede usarse en formulaciones farmacéuticas.

10

**Antecedentes**

Entre las inmunoterapias, las basadas en citocinas son de interés particular. Estas moléculas, que son moléculas solubles, son reguladoras de la inmunidad humoral y/o celular. Entre ellas, IL-2, IL-7, IL-12 e IL-15 son de interés más particular debido a que inducen la supervivencia y/o proliferación de linfocitos citotóxicos naturales; siendo así interesantes como adyuvante para tratar infección o cáncer.

15

La citocina interleucina-15 (IL-15) se identificó originalmente en sobrenadantes de cultivo de la línea celular epitelial de riñón de simio CV-1/EBNA y la línea celular de leucemia de células T HuT-102. La secuencia de ADNc de IL-15 codifica para una proteína precursora de 162 aminoácidos (aa) que consiste en un péptido líder de 48 aa de longitud y una proteína madura de 114 aa. Aunque no existe homología de secuencia con IL-2, el análisis de la secuencia de aminoácidos predice que IL-15, como IL-2, es miembro de la familia de citocinas de haz de cuatro hélices.

20

La interleucina-15 se considera en realidad como un fármaco futuro muy prometedor. Sin embargo, debido a su corta semivida y a otros parámetros, su producción en líneas de células de mamífero se realiza en realidad con bajos rendimientos.

25

Mortier *et al.* (JBC, vol. 281 n.º 3, 2006) dan a conocer un dominio sushi soluble recombinante de IL-15R $\alpha$ , que tiene la mayor afinidad de unión por IL-15, se comporta como un potente agonista de IL-15 mejorando su unión y sus efectos biológicos (proliferación y protección contra la apoptosis) a través del heterodímero IE-15K $\beta/\gamma$ , mientras que no afecta a la unión de IL-15 ni a la función del receptor de membrana tripartito IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ .

30

Los nuevos conjugados basados en interleucina-15 y su receptor IL-15 R alfa o fragmentos de los mismos se describieron en las patentes US 8.124.084 B2 y EP 1.934.353 B1.

35

Ahora, e incluso si estos conjugados tienen una semivida mucho mejor, su purificación se complicó por la formación de complejos diméricos y multiméricos. Además, debido a los altos porcentajes de agregados diméricos y oligoméricos, la composición purificada correspondiente no puede usarse como medicamento debido a su posible participación en las reacciones de inmunogenicidad/alergenicidad contra los productos biológicos inyectados (anticuerpos antifármaco, ADA).

40

Por tanto, existe la necesidad de un nuevo método de purificación para obtener una composición de conjugados que pueda usarse como medicamento.

45 **Sumario de la invención**

Se proporciona un método de purificación útil en la preparación de conjugado monomérico. Este método proporciona composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden tal conjugado monomérico. El método incluye condiciones que probablemente mejoran el replegamiento del conjugado durante el procedimiento de recuperación.

50

Los inventores han establecido ahora que un procedimiento de purificación que usa cromatografía de intercambio aniónico seguido por una cromatografía de interacción hidrófoba permite obtener el conjugado en una forma monomérica, mientras que una purificación usando cromatografía de interacción hidrófoba seguido por una cromatografía de intercambio aniónico no. Además, los inventores han establecido sorprendentemente que la etapa de carga de cromatografía de interacción hidrófoba debe realizarse mezclando el primer eluato con el tampón de carga directamente en una cámara de mezclado de dicha columna de cromatografía. De hecho, tal procedimiento de carga es el más eficiente que permite la obtención de una alta concentración de proteína de fusión activa en forma monomérica sin su coprecipitación en la resina cromatográfica.

55

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una composición que comprende conjugados monoméricos a partir de una muestra, comprendiendo dicho conjugado:

60

a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15, y

65

b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$ ;

mientras que dicho conjugado tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17,

5 en el que dicho método comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) realizada a un pH igual a o mayor de 7,0,

seguido por una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en dicha muestra llevada a cabo en una disolución de tampón que contiene una sal de amonio,

10 en el que dicha muestra corresponde a una muestra de un medio de cultivo de una célula huésped transformada que expresa el conjugado, correspondiendo dicha célula huésped a una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende células CHO, células HEK293, células COS, células PER.C6@, células SP2O, células NSO o cualquier célula derivada de las mismas, preferiblemente células CHO.

15 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede obtenerse mediante el método de la invención, comprendiendo dicha composición al menos el 80% de conjugados monoméricos.

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra dos perfiles de elución cromatográfica de producción de RLI en líneas de células CHO.

La figura 2 muestra un perfil de cromatografía de exclusión molecular de una producción de RLI en líneas de células CHO

30 La figura 3 muestra una inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo de IL-15 en RLI producido en líneas de células CHO (carriles 2 a 7) o en *Pichia pastoris* (carriles 9 y 10). La desglucosilación de RLI mediante PNGasa corresponde a los carriles 3, 5, 7 y 10.

La figura 4 muestra un cromatograma de SEC-MALLS para un producto de RLI (para dispersión de luz)

35 La figura 5 muestra la actividad de proliferación de diferentes producciones de RLI en líneas de células kit225.

La figura 6 muestra la actividad de proliferación de diferentes producciones de RLI en líneas de células 32DB.

40 La figura 7 muestra la proliferación de linfocitos citotóxicos naturales en ratones obtenida tras la inyección en ratones de varias muestras de RLI.

### Descripción detallada

45 La presente invención se refiere a un método novedoso para preparar una composición farmacéutica que comprende conjugados monoméricos.

50 El término "monomérico" pretende que la mayoría del conjugado presente en la composición sea monomérico en lugar de agregado. Por "agregado" se entiende una interacción física entre las moléculas de polipéptidos que da como resultado multímeros, es decir, dímeros u oligómeros, que permanecen solubles o que pueden precipitarse de la disolución. La mayoría de las veces, este estado agregado es irreversible y da como resultado la desnaturalización del conjugado tras su desnaturalización, debe indicarse que el conjugado puede asociarse con una fuerte inmunogenicidad.

55 El porcentaje (en peso) de conjugado en forma monomérica en esa composición será de al menos el 80% o mayor, es decir, en oposición a su forma agregada, preferiblemente desde al menos el 90% o más, y más preferiblemente desde al menos el 95% o más.

60 El término "muestra" se refiere a una muestra de un medio de cultivo de una célula huésped transformada que expresa el conjugado. Las células huésped usadas para la invención son células de mamífero, preferiblemente células CHO (ovario de hámster chino) tales como CHO K1 (número de ATCC CCL-31, CCL-61 o CRL-9618), CHO-DHFR (ATCC CRL-9096), CHO-DXB-11, células CHO que tienen el número de ATCC CRL 1610 o CHO DG44; HEK293 (riñón embrionario humano) tales como 293 (número ATCC CRL-1573) o HEK-293.2sus (número ATCC CRL-1573.3); células COS tales como COS-1 (número de ATCC CRL-1650) y COS-7 (número de ATCC CRL-1651); células PER.C6@ (líneas de células derivadas de retina humana; DSM BIOLOGICS, CRUCCELL); SP2O tales como  
65 las células SP2/O-Agl4 (número de registro de ATCC CRL-1851), células NSO o cualquier célula derivada de las mismas.

Preferiblemente, dicha célula huésped corresponde a líneas de células CHO.

El método comprende las etapas de:

- 5 (a) someter la muestra a cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para producir un primer eluato;
- (b) someter el primer eluato a cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para producir un segundo eluato.

10 La primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) puede realizarse usando una columna o resina de AEX seleccionada del grupo que comprende o que consiste en Q Sepharose, (por ejemplo, Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose XL, Q Sepharose big beads, Q sepharose high performance, Q sepharose XL), DEAE Sephadex A-25, DEAE Sephadex A-50, QAE Sephadex A-25, QAE Sephadex A-50, Source 15Q, Source 30Q, Resource Q, Capto Q, 15 Capto DEAE, Mono Q, Toyopearl Super Q, Toyopearl DEAE, Toyopearl QAE, Toyopearl Q, Toyopearl GigaCap Q, TSKgel SuperQ, TSKgel DEAE, Fractogel EMD TMAE, Fractogel EMD TMAE HiCap, Fractogel EMD DEAE, Fractogel EMD DMAE, Macroprep High Q, Macro-prep-DEAE, Unosphere Q, Nuvia Q, POROS HQ, POROS PI, DEAE Ceramic HyperD, y Q Ceramic HyperD. DEAE Sepharose Fast Flow, y ANX Sepharose 4 Fast Flow.

20 Ventajosamente, la resina o columna de AEX corresponde a Q Sepharose o DEAE Sepharose, y más preferiblemente a un intercambiador aniónico fuerte tal como Q Sepharose.

Ahora, esta etapa a) se realiza normalmente en varias etapas que comprenden equilibrado de la columna o resina, exploración de la muestra y elución. Pueden incluirse una o más etapas de lavado después de la carga y antes de la elución.

25 La etapa de equilibrado se realiza de manera sencilla según las instrucciones del fabricante.

30 Tal como se determinó por los inventores, la etapa de exploración se realiza usando un tampón de NaCl. Como ejemplo, el tampón de exploración comprende NaCl de 0,5 M a 1,5M, preferiblemente de 0,75 M a 1,25 M, y lo más preferiblemente NaCl 1 M.

Esta etapa de exploración se realiza preferiblemente en sobrenadante de cultivo concentrado y diafiltrado usando un casete de ultrafiltración.

35 Los fabricantes de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) sugieren el uso de un pH de al menos una unidad de pH menos del punto isoeléctrico de la proteína que va a purificarse.

40 Inesperadamente, y mientras que RLI1 (SEQ ID NO: 16) o RLI2 (SEQ ID NO: 17) tiene un punto eléctrico de casi 5,5, los inventores han establecido que la etapa a) debe realizarse a un pH igual a o mayor de 7,0, y preferiblemente igual a o mayor de 7,5.

45 La etapa de elución para la cromatografía de intercambio aniónico (AEX) se lleva a cabo en un gradiente usando tampón salino de NaCl desde 1 hasta 0 M, y preferiblemente NaCl desde 0,75 hasta 0 M.

La etapa b) de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) puede realizarse usando una columna o resina de HIC seleccionada del grupo que comprende o que consiste en Phenyl Sepharose, Butyl Sepharose, Octyl Sepharose, ToyoPearl Hexyl-650, ToyoPearl Ether-650, Hydrocell C3, Hydrocell Phenyl 1500 o Hydrocell C4 1500.

50 Ventajosamente, la resina o columna de HIC corresponde a Phenyl Sepharose.

Como para la etapa a), esta etapa b) incluye normalmente varias etapas que comprenden equilibrado de la columna o resina, carga de la muestra y elución. Pueden incluirse una o más etapas de lavado después de la carga y antes de la elución.

55 De nuevo, la etapa de equilibrado se realiza de manera sencilla según las instrucciones del fabricante.

60 Para la etapa de exploración, la disolución de tampón contiene una sal de amonio tal como sulfato de amonio o acetato de amonio, preferiblemente sulfato de amonio. Como ejemplo, el tampón de exploración comprende sulfato de amonio de 0,75 M a 2,5 M, preferiblemente sulfato de amonio de 1 M a 2 M, y lo más preferiblemente sulfato de amonio de 1,5 a 2 M.

Esta etapa de exploración es crítica. En la experiencia realizada por los inventores, toda la purificación da como resultado una cantidad variable de conjugado, conjugado que estaba principalmente en forma agregada.

65 Inesperadamente, los inventores lograron obtener formas monoméricas de conjugado mezclando el primer eluato

obtenido de la etapa a) con el tampón de exploración directamente en dicha columna o resina cromatográfica, más especialmente de manera directa en una cámara de mezclado de dicha columna o resina cromatográfica.

5 La etapa de elución se lleva a cabo en un gradiente usando solución salina de tampón, sulfato de amonio desde 2 hasta 0 M, preferiblemente sulfato de amonio desde 1,5 hasta 0 M.

El método de la invención puede comprender una o más etapas adicionales.

10 Como ejemplo, el método de la invención puede comprender la etapa de someter el segundo eluato a cromatografía de exclusión molecular (SEC) para producir un tercer eluato.

Esta etapa de cromatografía de exclusión molecular (SEC) puede realizarse usando una columna de SEC de tipo Superdex 200 o Superdex 75.

15 Como otro ejemplo, el método de la invención también puede comprender la etapa de someter el segundo eluato a todavía otra cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para producir un tercer eluato.

Esta etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse tal como se describió previamente.

20 En todavía una realización preferida, el método de la invención comprende además la etapa de usar el conjugado obtenido para la preparación de un medicamento.

El término "conjugado" se usa en su significado general en la técnica y se refiere a un complejo covalente o no covalente, preferiblemente a un complejo covalente, y lo más preferiblemente a una proteína de fusión.

25 El término "interleucina 15" en su significado general en la técnica y se refiere a una citocina con similitud estructural con IL-2 (GRABSTEIN *et al.*, Science, vol. 264 (5161), págs.: 965-968, 1994). Esta citocina también se conoce como IL-15, IL15 o MGC9721. Esta citocina e IL-2 comparte muchas actividades biológicas y se encontró que se unen a subunidades comunes de receptores de hematopoyetina. Por tanto, pueden competir por el mismo receptor, regulando negativamente la actividad del otro. Se ha establecido que IL-15 regula la activación y proliferación de células T y linfocitos citolíticos naturales, y que se muestra que el número de células de memoria CD8+ está controlado por un equilibrio entre esta citocina e IL2. La actividad de IL-15 puede medirse determinando su inducción de la proliferación en la línea de células kit225 (HORI *et al.*, Blood, vol. 70 (4), págs.: 1069-72, 1987), tal como se da a conocer en los ejemplos.

35 Dicha IL-15 o los derivados de la misma tienen al menos el 10% de la actividad de la interleucina-15 humana en la inducción de la proliferación de la línea de células kit225, preferiblemente al menos el 25%, y más preferiblemente al menos el 50%.

40 Dicha interleucina 15 es una interleucina 15 de mamífero, preferiblemente una interleucina 15 de primate, y más preferiblemente una interleucina 15 humana.

45 La interleucina 15 de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Como ejemplo, se puede citar la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Rattus norvegicus* (número de registro NP\_037261), de *Mus masculus* (número de registro NP\_032383), de *Bos Taurus* (número de registro NP\_776515), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP\_001075685), de *Ovies aries* (número de registro NP\_001009734), de *Felis catus* (número de registro NP\_001009207), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP\_000576), de *Macaca Mulatta* (número de registro NP\_001038196), de *Cavia porcellus* (número de registro NP\_001166300) o de *Chlorocebus sabaues* (número de registro ACI289).

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "interleucina 15 de mamífero" se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 1.

55 La interleucina 15 de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Como ejemplo, puede citarse la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP\_001075685), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP\_000576), de *Macaca Mulatta* (número de registro NP\_001038196) o de *Chlorocebus sabaues* (número de registro ACI289).

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "interleucina 15 de primate" se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 2.

65 La interleucina 15 humana puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados de interleucina 15” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 10 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos) o de al menos el 99% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados pueden identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica en vista de su conocimiento personal y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. Como ejemplo de tales derivados, pueden citarse los descritos en la solicitud de patente internacional WO 2009/135031. También se entenderá que los aminoácidos naturales se reemplazarán por aminoácidos modificados químicamente. Normalmente, tales aminoácidos modificados químicamente aumentan la semivida del polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de aminoácidos significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que van a compararse, obtenido con la mejor alineación de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre estas dos secuencias se extienden aleatoriamente a lo largo de las secuencias de aminoácidos. Tal como se usa en el presente documento, “mejor alineación” o “alineación óptima” significa la alineación para la cual el porcentaje de identidad determinado (véase a continuación) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realiza habitualmente comparando estas secuencias que se han alineado previamente según la mejor alineación; esta comparación se realiza en segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. La mejor alineación de secuencias para realizar la comparación puede lograrse, además de mediante una manera manual, usando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2, pág.: 482, 1981), usando el algoritmo de homología local desarrollado por NEEDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, págs.: 443, 1970), usando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, pág.: 2444, 1988), usando el software informático que usa dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, EE. UU.), usando los algoritmos de alineación múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, pág.: 1792, 2004) Para obtener la mejor alineación local, puede usarse preferiblemente el software BLAST con la matriz BLOSUM 62. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, pudiendo abarcar las secuencias de aminoácidos adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número entre el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Preferiblemente, los derivados de interleucina 15 son agonistas o superagonistas de IL-15. Un experto en la técnica puede identificar de manera sencilla un agonista o superagonista de IL-15. Como ejemplo de agonista o superagonista de IL-15, pueden citarse los descritos en la solicitud de patente internacional WO 2005/085282 o en ZHU *et al.* (J. Immunol., vol. 1983 (6), pág.: 3598-607, 2009).

Todavía preferiblemente, dicho agonista o superagonista de IL-15 se selecciona del grupo que comprende/consiste en L45D, L45E, S51D, L52D, N72D, N72E, N72A, N72S, N72Y y N72P (en referencia a la secuencia de IL-15 humana, SEQ ID NO: 3).

Tal como se usa en el presente documento, el término “el dominio sushi de IL-15R $\alpha$ ” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un dominio que comienza en el primer residuo de cisteína (C1) después del péptido señal de IL-15R $\alpha$  y que finaliza en el cuarto residuo de cisteína (C4) después de dicho péptido señal. Dicho dominio sushi correspondiente a una porción de la región extracelular de IL-15R $\alpha$  es necesario para su unión a IL-15 (WEI *et al.*, J. Immunol., vol. 167 (1), págs.: 277-282, 2001).

Dicho dominio sushi de IL-15R $\alpha$  o derivados del mismo tiene al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R $\alpha$  humano a interleucina-15 humana, preferiblemente al menos el 25%, y más preferiblemente al menos el 50%. Dicha actividad de unión puede determinarse de manera sencilla mediante el método dado a conocer en WEI *et al.* (mencionado anteriormente, 2001).

Dicho dominio sushi de IL-15R $\alpha$  es el dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de mamífero, preferiblemente el dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de primate, y más preferiblemente el dominio sushi de IL-15R $\alpha$  humano.

El dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Como ejemplo, puede citarse el dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de *Rattus norvegicus* (número de registro XP\_002728555), de *Mus masculus* (número de registro EDL08026), de *Bos Taurus* (número de registro XP\_002692113), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro XP\_002723298), de *Macaca fascicularis* (número de registro ACI42785), de *Macaca nemestrina* (número de registro ACI42783), de *Homo sapiens* (número de registro

CAM 1081), de *Macaca Mulatta* (número de registro NP\_001166315), *Pongo abelii* (número de registro XP\_002820541), *Cercocebus torquatus* (número de registro ACI42784), *Callithrix jacchus* (número de registro XP\_002750073) o de *Cavia porcellus* (número de registro NP\_001166314).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de mamífero” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 4.

Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de mamífero se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 5.

10 El dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Como ejemplo, pueden citarse dominios sushi de IL-15R $\alpha$  de *Oryctolagus cuniculus*, de *Macaca fascicularis*, de *Macaca nemestrina*, de *Homo sapiens*, de *Macaca Mulatta*, *Pongo abelii*, *Cercocebus torquatus* o *Callithrix jacchus*.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de primate” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de un IL-15R $\alpha$  de primate se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 7.

20 El dominio sushi de IL-15R $\alpha$  humano puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

25 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$  humano se refiere a SEQ ID NO: 9.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados del dominio sushi de IL-15R $\alpha$ ” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R $\alpha$  y pueden identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También se entenderá que los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por aminoácidos modificados químicamente. Normalmente, tales aminoácidos modificados químicamente permiten aumentar la semivida del polipéptido.

40 Según una realización preferida, el conjugado comprende (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$ .

45 El dominio bisagra de IL-15R $\alpha$  se define como la secuencia de aminoácidos que comienza en el primer residuo amino después del dominio sushi y que finaliza en el último residuo de aminoácido antes del primer sitio de glicosilación posible. En IL-15R $\alpha$  humano, la secuencia de aminoácidos de la región bisagra consiste en los catorce aminoácidos que se ubican después del dominio sushi de este IL-15R $\alpha$ , en una posición C-terminal en relación con dicho dominio sushi, es decir, dicha región bisagra de IL-15R $\alpha$  comienza en el primer aminoácido después de dicho residuo de cisteína (C4) y finaliza en el decimocuarto aminoácido (contando en la orientación convencional “desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal”).

50 Dichos dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$  son los dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de mamífero, preferiblemente los dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de primate, y más preferiblemente los dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$  humano.

55 La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de mamífero” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 10.

60 La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de un IL-15R $\alpha$  de primate” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 11.

La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$  humano puede identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$  humano” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID NO: 12.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados de los dominios sushi y bisagra de IL-15R $\alpha$ " se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 93% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12, preferiblemente de al menos el 97% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R $\alpha$  y pueden identificarse de manera sencilla por el experto en la técnica en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. Se entenderá que los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por aminoácidos modificados químicamente. Normalmente, tales aminoácidos modificados químicamente permiten aumentar la semivida del polipéptido.

Ambos polipéptidos a) y b) del conjugado pueden estar unidos de forma no covalente, tal como en el complejo dado a conocer en la patente US 8.124.084 B2. Dicho conjugado o complejo puede obtenerse de manera sencilla proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido a), proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido b), mezclando ambos polipéptidos en condiciones de pH e iónicas adecuadas durante un tiempo suficiente para permitir la formación del complejo (es decir, conjugado), y opcionalmente concentrando o purificando dicho complejo. Los polipéptidos del complejo (es decir, conjugado) pueden formarse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos según métodos convencionales; expresando cada polipéptido por separado en una célula o un extracto celular, luego aislando y purificando el polipéptido. Opcionalmente, el complejo de polipéptido terapéutico puede formarse expresando ambos polipéptidos i) y ii) en la misma célula o el mismo extracto celular, luego aislando y purificando los complejos, por ejemplo, usando técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de afinidad con anticuerpos para la porción de linfocinas, la porción del receptor de linfocinas o para el complejo.

Ambos polipéptidos a) y b) del conjugado también pueden unirse de manera covalente usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales o en una proteína de fusión.

Los polipéptidos a) y b) del conjugado pueden estar glicosilados o no glicosilados. De hecho, los inventores han establecido que el RLI tanto glicosilado como no glicosilado tienen la misma actividad específica *in vitro*. Ahora, los polipéptidos a) y b) del conjugado están preferiblemente glicosilados.

Los agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales se conocen bien por el experto en la técnica, tal como los métodos que los usan, e incluyen, como ejemplos, (2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono).

El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína creada a través de la unión de dos o más genes que codificaron originalmente para proteínas separadas. También se conoce como proteína quimérica. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales que se derivan de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica. Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada mediante ingeniería genética de un gen de fusión. Esto implica normalmente eliminar el codón de parada de una secuencia de ADNc que codifica para la primera proteína, y luego añadir la secuencia de ADNc de la segunda proteína en el marco a través de PCR de ligamiento o extensión por superposición. Luego, esa secuencia de ADN se expresará por una célula como una única proteína. La proteína puede diseñarse para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o sólo una parte de cualquiera de ellas.

En todas las realizaciones, el conjugado es una proteína de fusión.

La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma puede estar en una posición C-terminal o en una N-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$  o derivados del mismo. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la interleucina 15 o derivados de la misma está en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$  o derivados del mismo.

La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma y la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$  o derivados del mismo pueden separarse mediante una secuencia de aminoácidos "ligadora". Dicha secuencia de aminoácidos "ligadora" puede tener una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forme estructuras secundarias y terciarias apropiadas.

La longitud de la secuencia de aminoácidos ligadora puede variar sin afectar significativamente a la actividad

biológica de la proteína de fusión. Normalmente, la secuencia de aminoácidos ligadora comprende al menos uno, pero menos de 30 aminoácidos, por ejemplo, un ligador de 5-30 aminoácidos, preferiblemente de 10-30 aminoácidos, más preferiblemente de 15-30 aminoácidos, aún más preferiblemente de 15-25 aminoácidos, lo más preferiblemente de 18-22 aminoácidos.

5 Las secuencias de aminoácidos ligadoras preferidas son aquellas que permiten que el conjugado adopte una conformación apropiada (es decir, una conformación que permite una actividad de transducción de señales apropiada a través de la ruta de señalización de IL-15Rbeta/gamma).

10 Las secuencias de aminoácidos ligadoras más adecuadas (1) adoptarán una conformación extendida flexible, (2) no presentarán una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pueda interactuar con los dominios funcionales de proteínas de fusión y (3) tendrán un carácter hidrófobo o cargado mínimo que podría fomentar la interacción con los dominios de proteínas funcionales.

15 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos ligadora comprende aminoácidos casi neutros seleccionados del grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q), lo más preferiblemente del grupo que comprende Gly (G), Asn (N) y Ser (S).

Ejemplos de secuencias ligadoras se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 5.073.627 y 5.108.910.

20 Los ligadores flexibles ilustrativos incluyen los codificados por las secuencias SEQ ID NO: 13 (SGGSGGGSGGGSGGGSLQ), SEQ ID NO: 14 (SGGSGGGSGGGSGGGSGG) o SEQ ID NO: 15 (SGGSGGGSGGGSGGGSLQ).

25 En todas las realizaciones, el conjugado es una proteína de fusión que tiene la secuencia SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado monomérico de este tipo, eventualmente asociado con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen reacciones alérgicas o similares indeseables, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluirse en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

35 El término "portador" se refiere a un disolvente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

45 La vía de administración de la combinación de la invención es preferiblemente parenteral; tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Por tanto, la composición farmacéutica contiene vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación destinada a ser inyectada. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Los

50 portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

De éstas, la administración intravenosa es la más preferida.

55 El conjugado puede solubilizarse en un tampón o agua o incorporarse en emulsiones, microemulsiones, hidrogeles (por ejemplo, hidrogeles a base de copolímeros tribloque PLGA-PEG-PLGA), en microesferas, en nanoesferas, en micropartículas, en nanopartículas (por ejemplo, poli(ácido láctico-co-glicólico), micropartículas (por ejemplo, poli(ácido láctico) (PLA); poli(láctida-co-ácido glicólico) (PLGA); microesferas, nanoesferas, micropartículas o nanopartículas de poliglutamato), en liposomas u otras formulaciones galénicas. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida en la medida de la jeringabilidad aceptable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

60 Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

65

El conjugado puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, y similares.

El portador también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Los conjugados de la invención también pueden modificarse, por ejemplo, mediante pegilación, para aumentar su biodisponibilidad.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polioles, formulaciones covalentes y no covalentes que mejoran la semivida.

Existen numerosos motivos para la inestabilidad o degradación de péptidos, incluyendo la hidrólisis y la desnaturalización. La interacción hidrófoba puede provocar la aglutinación de moléculas (es decir, agregación). Pueden añadirse estabilizadores para reducir o prevenir tales problemas.

Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y derivados de la misma (véase la patente estadounidense n.º 5.730.969). También pueden añadirse conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final. Puede añadirse a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos iónicos y no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-galacturónico, trehalosa, dextranos, hidroxietilalmidones, y mezclas de los mismos. La adición de sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un péptido. El péptido también puede estabilizarse poniéndolo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitinsulfúrico, almidón, glucógeno, dextrina y sal de ácido algínico. Otros azúcares que pueden añadirse incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar, y mezclas de los mismos (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un péptido y son miscibles en agua o solubles en agua. Los polioles adecuados pueden ser alcoholes polihidroxilados, monosacáridos y disacáridos incluyendo manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, vinilpirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa y polímeros de los mismos. Diversos excipientes también pueden estabilizar péptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metales, polivinilpirrolidona, gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de este tipo para su uso en el tratamiento del cáncer. Una composición farmacéutica de este tipo se describe adicionalmente para su uso en el tratamiento de una infección, y/o un trastorno de inmunodeficiencia en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un cánido o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

En el contexto de la invención, el término "tratar", tal como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o estado al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o estado.

El término "tratar el cáncer" tal como se usa en el presente documento significa la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, tal tratamiento también conduce a la regresión del crecimiento tumoral, es decir, la disminución del tamaño de un tumor medible. Lo más preferiblemente, tal tratamiento conduce a la regresión completa del tumor.

El término "tratar una infección" tal como se usa en el presente documento significa la inhibición de la replicación/proliferación de microbios.

El término "tratar un trastorno de inmunodeficiencia" tal como se usa en el presente documento significa la inducción de linfocitos citolíticos naturales y/o células T.

Una "cantidad eficaz" del conjugado es una cantidad que es suficiente para inducir la regresión del crecimiento tumoral o la replicación de los microbios. Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de

diversos parámetros, en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento. Naturalmente, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente del estado que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc. Los intervalos de dosis eficaces proporcionadas a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida puede adaptarse al sujeto individual, tal como entiende un experto en la técnica y puede determinar sin demasiada experimentación.

### Ejemplos

#### 1) *Análisis del perfil de producción de RLI*

Se clonó la secuencia de nucleótidos que codifica para RLI1 y RLI2 (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17) en plásmidos pcDNA3.1 mediante GENEART. Se obtuvo un PEI lineal de 40 kDa de POLYSCIENCE. Se preparó una disolución de reserva 1 mg/ml disolviendo el PEI en agua con calentamiento, neutralización con NaOH y esterilización por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Se tomaron alícuotas de la reserva de disolución y se almacenaron a -20°C. Se purificó el ADN de plásmidos para transfecciones usando los kits de purificación de plásmidos según el protocolo del fabricante (MACHEREY-NAGEL) y esterilizando por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

Se sembraron las células CHO-S (INVITROGEN) mantenidas de manera rutinaria a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio PowerCHO2 (LONZA), y se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora con agitación (100 rpm) con el 5% de CO<sub>2</sub>. Para la transfección, se diluyeron entonces las células en medio CD-CHO (INVITROGEN) hasta 2 x 10<sup>6</sup> células/ml. Se prepararon los complejos de transfección en el 10% del volumen de cultivo usando NaCl 150 mM. Se mezcló el ADN de constructos de expresión (2,5 mg/l de volumen de cultivo) con PEI diluido en NaCl (10 mg/l de volumen de cultivo final) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de la adición al cultivo. Se cultivaron las células en una incubadora con agitación (130 rpm) a 37°C durante 5 h antes de duplicar el volumen de cultivo con medio PowerCHO2. Se recogieron los sobrenadantes 5 días después de la transfección.

Se centrifugó el sobrenadante recogido a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se equilibró a pH 7,8 con NaOH y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm antes del análisis. Se analizó el patrón de expresión de RLI usando SUPERDEX 200 5/150 GL según las instrucciones del fabricante. Para este análisis, se usaron muestras diluidas (0,15 mg/ml) y no diluidas. La velocidad de flujo fue de 0,2 ml/min y el tampón de transferencia PBS. Se controló la elución de la proteína mediante absorbancia a 215 nm.

Los resultados para diferentes purificaciones se muestran en la tabla I y en la figura 1.

Tabla I

Lote	Agregados solubles	Número de picos	Agregados de oligómeros	Monómero	Tamaño de monómero (kDa)
1	Sí	2(+)	48%	52%	27,64
2	Sí	2	43%	57%	26,28

Los resultados muestran la existencia de dos picos distintivos en el cromatograma. El primer pico corresponde a los agregados cuyo tamaño es mayor de 2000 kDa. El segundo pico corresponde al monómero de RLI. Ahora, este segundo pico contiene a veces un hombro (indicado por una flecha) que podría representar un dímero de RLI.

Por tanto, la producción de RLI contiene una mera proporción de agregados. Esta conclusión no es sorprendente ya que se sabe que IL15 sola se agrega a bajo nivel en el sobrenadante de cultivo. Ahora, tal agregación es problemática ya que la composición obtenida no puede usarse como composición farmacéutica.

Según la bibliografía, los motivos de la agregación pueden ser múltiples. Tal agregación puede producirse desde el procedimiento de cultivo celular hasta la operación de llenado final. Esta agregación puede ser el resultado de componentes del medio (debido a proteínas de la célula huésped, concentración de RLI u oxígeno disuelto), del procedimiento de purificación (debido a la técnica de purificación (HIC, AEX, afinidad...)), de las condiciones de elución (pH, fuerza iónica, concentración de proteína...), del procedimiento de ultrafiltración/diafiltración (tensión de corte, concentración superficial) o de la formulación (debido al tampón (pH, fuerza iónica, excipiente...)). Debido a esta ecuación de múltiples parámetros, la identificación del motivo de agregación durante el procedimiento general es un trabajo muy desafiante, trabajo que no siempre es exitoso.

#### 2) *Análisis mediante fraccionamiento*

Con el fin de determinar el comportamiento cromatográfico de los componentes purificados y analizar el contenido

de cada pico de elución, se analizó una muestra de una proteína previamente purificada usando SUPERDEX 75 10/300 GL según las instrucciones del fabricante. Para este análisis, se usó una muestra de 50 µl. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y el tampón de transferencia fue PBS. Se controló la elución de la proteína mediante absorbancia a 215 nm.

5 El cromatograma de SEC (cromatografía de exclusión molecular) se muestra en la figura 2, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de algunas fracciones de elución se muestra en la figura 3 y los resultados para esta purificación se resumen en la tabla II.

10 Tabla II

Lote	Agregados solubles	Número de picos	Agregados de oligómeros	Monómero	Tamaño de monómero (kDa)
3	Sí	3(+)	49%	51%	28,12

15 Los resultados confirman la existencia de un primer pico correspondiente al límite de exclusión de la columna (figura 2). Este pico comprende los agregados solubles (> 110 kDa) de la proteína RLI, agregados que comprenden proteínas RLI tanto glicosiladas como no glicosiladas (figura 3). El segundo pico corresponde a un dímero de RLI y el tercero a una proteína globular de 28,5 kDa correspondiente al monómero de RLI (figura 2). La electroforesis capilar ha demostrado que este tercer pico comprende tanto formas glicosiladas como no glicosiladas, pero con una elución ligeramente desplazada (figura 3). Como control, se usó proteína purificada de *Pichia pastoris*. Tal como se esperaba, la forma glicosilada se eluye antes que la no glicosilada.

20 Finalmente, la distribución de especies es consistente con el análisis previo con el 49% de oligómeros y/o agregados y el 51% de monómeros.

25 Se ha notificado que la temperatura de almacenamiento, es decir 4°C o -80°C, no influye en el estado de oligomerización de RLI. Además, estos resultados han demostrado que RLI es muy estable cuando se almacena a 4°C y también después de 6 ciclos de congelación/descongelación a -80°C.

30 Para caracterizar mejor el estado de agregación de los productos de RLI, SEC-MALLS (cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión de luz por láser de ángulo múltiple). Este método permite determinar la distribución en tamaño de las diferentes especies multiméricas contenidas en la muestra de proteína. Con este método, las diferentes especies se separan primero y se diluyen mediante SEC y luego se analizan mediante MALLS.

35 Para este análisis, se usaron muestras de aproximadamente 35 µg de proteínas. La velocidad de flujo fue de 0,35 ml/min a 20°C con un tampón de SEC (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM) en una columna SHODEX (kW402.5-4F) según las instrucciones del fabricante. Se usó el sistema de cromatografía INFINITY 1260 como detector de HPLC, se usó DAW-HELEOS 8+ (WYATT TECHNOLOGIES) como detector de MALLS y se usó OPTILABrEX.

40 La figura 4 muestra un ejemplo de un cromatograma de SEC-MALLS para un producto de RLI (para dispersión de luz).

La tabla III da a conocer la distribución de los diferentes picos de proteínas para dos lotes de RLI a temperatura ambiente y tras tres horas de incubación.

45 Tabla III

Lote	Tiempo después de la descongelación	Agregados 1 (%)	Agregados 2 (%)	Octámeros (%)	Tetrámeros (%)	Dímeros (%)	Monómeros (%)
4	0 h	74,2	0,0	0,0	3,8	6,5	15,5
	3 h	74,4	0,0	0,0	3,7	6,5	15,4
5	0 h	31,3	0,0	0,0	6,5	11,5	50,6
	3 h	31,7	0,0	0,0	6,9	10,5	50,7

50 Los resultados han establecido la existencia de seis picos de proteínas con algunos menores correspondientes a diferentes formas de RLI en la mayoría de las muestras. Ahora, estos picos no muestran una evolución significativa en su distribución después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente.

Estos resultados confirman la existencia de formas multiméricas en relación con la monomérica.

3) Primera etapa de purificación

Esta primera etapa de purificación se desarrolló para la producción de RLI en *Pichia pastoris*. En una primera etapa de clarificación, se filtraron diferentes sobrenadantes obtenidos de la producción de RLI en células CHO con una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (celulosa). Luego, se sometieron a diafiltración estos sobrenadantes con Tris HCl pH 7,5. Luego se disolvió sulfato de amonio (AS =  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) en los sobrenadantes diafiltrados para obtener una concentración final de AS de 1,5 M correspondiente al tampón de unión. Luego se exploraron las columnas de cromatografía de interacción hidrófoba (Phenyl Sepharose FF) con los tampones de unión obtenidos.

10 Luego se realizó la elución según las instrucciones del fabricante.

En comparación con la producción de *Pichia pastoris*, esta primera etapa de purificación da como resultado un rendimiento muy bajo y una mala reproducibilidad.

15 Debido a un experimento incorrecto, se usó una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para la primera etapa. Sorprendentemente, los inventores observaron que esta cromatografía específica permite obtener un rendimiento muy bueno. Como resultado de experimentos adicionales, se observó este rendimiento muy bueno con una reproducibilidad muy buena.

20 Los experimentos comparativos entre DEAE-Sepharose y Q-Sepharose han demostrado que los mejores rendimientos se obtuvieron con Q Sepharose y que el tampón óptimo para explorar en Q-Sepharose o DEAE-Sepharose fue Tris HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 1 M. Mientras que las instrucciones del fabricante sugieren el uso de un tampón de exploración cuyo pH es de al menos una unidad menos que el pI de la proteína que va a purificarse, los resultados han demostrado inesperadamente que la mejor exploración se obtiene a un pH igual a o mayor de 7,5 (tampón Tris HCl), pH que es casi dos unidades más que la proteína RLI. Ahora, un pH más bajo da como resultado una exploración muy mala y, por tanto, un rendimiento y una reproducibilidad bajos para la purificación de proteínas RLI.

30 Además, parece que el ADN de las células HO se une a RLI y el eluato obtenido después de esta primera etapa de purificación está contaminado por este ADN.

4) Segunda etapa de purificación

35 Para obtener una composición libre de ácidos nucleicos y de endotoxinas, los inventores han iniciado una segunda tanda de purificación.

Los mejores resultados se obtuvieron con columnas de cromatografía de interacción hidrófoba (Phenyl Sepharose, Butyl Sepharose, Octyl Sepharose) con Tris HCl 20 mM pH 7,5 - sulfato de amonio 2 M (AS =  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

40 Ahora, y en cuanto a las experiencias para la purificación de la primera etapa, estas experiencias permiten obtener proteína RLI con un rendimiento y una reproducibilidad muy malos.

45 De manera fortuita, los inventores observaron que cuanto más rápidamente se cargaba la mezcla, es decir, de la muestra con sulfato de amonio, después de su obtención, mejores eran el rendimiento y la reproducibilidad. Parece que la ventana de estabilidad de la sal de la proteína depende de muchos parámetros, incluida la temperatura que afecta al procedimiento de purificación. En consecuencia, los inventores mezclan sulfato de amonio, es decir, hasta 0,75 M, y el primer eluato directamente en las columnas de cromatografía de interacción hidrófoba para la etapa de exploración.

50 Después de las etapas de lavado y elución usando un gradiente entre la disolución de tampón A2 (Tris HCl 20 mM, pH 7,5) y la disolución de tampón B2 (Tris HCl 20 mM, sulfato de amonio 2 M, pH 7,5), se obtuvo la proteína RLI con un rendimiento y una reproducibilidad muy buenos al 37,5% del gradiente. La forma glicosilada se eluye un poco más tarde que la forma no glicosilada, y se superpone de manera parcial la ventana de elución de la forma no glicosilada. Al final, se concentró la muestra hasta de 0,5 a 1 mg/l en un casete de ultrafiltración con un MWCO (*Molecular weight cut-off*, valor de corte de peso molecular) de 5 kDa, y se sometió a diafiltración frente al tampón PBS.

60 Finalmente, los resultados obtenidos con el procedimiento de purificación de los inventores han demostrado que la proteína RLI se obtuvo con una pureza de más del 98%, sin endotoxinas, proteínas de choque térmico ni ADN residual detectables. Además, el análisis de la composición obtenida ha demostrado que más del 90% de la proteína RLI está en forma monomérica que satisface su uso en una composición farmacéutica.

5) Actividad de proliferación de la composición farmacéutica obtenida

65 Con el fin de someter a prueba la actividad de proliferación de interleucina-15 de las proteínas purificadas, se midieron las respuestas proliferativas de las células Kit 225 y 32D $\beta$  a ICK para dichas proteínas mediante

incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina.

Se mantuvieron las células en medio de cultivo durante 3 días, se lavaron dos veces y se les privó de alimento en medio sin citocinas durante 24 h o 4 h para Kit 225 y 32Dβ, respectivamente. Luego se sembraron en placas de múltiples pocillos a 10<sup>4</sup> células/pocillo en 100 μl, y se cultivaron durante 48 h en medio complementado con una concentración creciente de varias muestras de RLI de CHO. Se usaron como control rIL-15 humano y RLI de baculovirus y de *Pichia pastoris*.

Se sometieron a pulsos las células durante 16 h con 0,5 μCi/pocillo de [<sup>3</sup>H]-timidina, se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se midió la radiactividad asociada a las células.

Las figuras 5 y 6 muestran la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina por las células Kit 225 y 32Dβ cultivadas respectivamente con concentraciones crecientes de rIL-15, de RLI de baculovirus, de RLI de *Pichia pastoris* y de RLI purificado de varias producciones de CHO.

Los resultados muestran que la actividad biológica de la proteína RLI purificada con el método de purificación de la invención tiene una actividad comparable a las proteínas RLI parcialmente purificadas. Por consiguiente, el método de purificación de la invención no altera la actividad biológica de RLI.

#### 6) Bioactividad de la composición farmacéutica obtenida en un modelo in vivo de ratón

Se inyectó a ratones C57BL/6 obtenidos de Harlan Laboratories por vía intraperitoneal (i.p.) en el día 0 y el día 1 con 100 μl de PBS, como control negativo, RLI de baculovirus (2 μg/ratón), RLI de *Pichia pastoris* (2 μg/ratón) y RLI purificado de la producción de CHO (2 μg/ratón). Se usaron 5 ratones por grupo.

Se sacrificaron los ratones mediante luxación cervical y se retiraron los bazo el día 4. Se disoció el bazo en una suspensión de células individuales en un filtro de células de 100 μm con la parte posterior de una jeringa. Luego, se lisaron los glóbulos sanguíneos usando una disolución de ACK (cloruro de amonio-potasio). Se lavaron los esplenocitos dos veces en un medio completo y se contaron las células viables usando portaobjetos Kova. Se tiñeron dos millones de esplenocitos con los siguientes anticuerpos: anti-CD3, CD4, CD8, NKp46 y LIVE/DEAD® Fixable Aqua para seleccionar células viables. Luego, se permeabilizaron los esplenocitos según el protocolo de fabricación (tampones de permeabilización EBIOSCIENCE FOXP3) y se tiñeron con anti-FoxP3 y Ki67. Se usó el isotipo de Ki67 para identificar células positivas. Las células teñidas se detectaron inmediatamente en un citómetro de flujo FACSCANTO II y se realizaron los análisis usando el software FLOWJO (TREE STAR). Los linfocitos citolíticos naturales son células positivas para NKp46 negativas para CD3.

La figura 7 representa la proporción de linfocitos citolíticos naturales proliferantes, células T CD8<sup>+</sup>, células T Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y células T Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>

La figura 7 muestra la razón de linfocitos citolíticos naturales y el número absoluto de linfocitos citolíticos naturales para cada grupo.

La figura 7 también muestra el porcentaje de linfocitos citolíticos naturales proliferativos en comparación con los linfocitos citolíticos naturales totales y el número absoluto de linfocitos citolíticos naturales proliferativos.

Los resultados muestran que RLI producido en *Pichia pastoris* tiene mala actividad *in vivo* en comparación con RLI producido en baculovirus. Satisfactoriamente, RLI producido en CHO y purificado mediante el método de la invención muestra una actividad *in vivo* muy buena en linfocitos citolíticos naturales.

#### Lista de secuencias

<110> CYTUNE PHARMA  
BECHARD, David  
DE MARTINOFF, Guy

<120> MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE CONJUGADOS BASADOS EN IL-15/IL-15RALFA

<130> CYT-B-0006-PCT1

<150> documento EP 14000742.8  
<151> 03-03-2014

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- 5 <213> secuencia artificial
  
- <220>
- <223> secuencia de consenso de interleucina 15 de mamifero
  
- 10 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> X= N, S, T o I
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> X= V, H, I, Q o E
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> X= N, Y, F o D
  
- 25 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (6)..(6)
- <223> X= I o R
  
- 30 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X= S, N, L, Y, K o R
  
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (10)..(10)
- <223> X= K, E, R o Q
  
- 40 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (11)..(11)
- <223> X= K, T o R
  
- 45 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> X= E, D o Q
  
- 50 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (14)..(14)
- <223> X= D, H, S o N
  
- 55 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (16)..(16)
- <223> X= I o T
  
- 60 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (17)..(17)
- <223> X=Q, R o K
  
- 65 <220>
- <221> MISC\_FEATURE

- <222> (18)..(18)  
<223> X= S o F
- <220>

5   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (19)..(19)  
       <223> X= M, I o L
- <220>

10   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (21)..(21)  
       <223> X= I, V o M
- <220>

15   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (23)..(23)  
       <223> X=A o T
- <220>

20   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (28)..(28)  
       <223> X=E o D
- <220>

25   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (30)..(30)  
       <223> X= D o G
- <220>

30   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (31)..(31)  
       <223> X= V, F, A o I
- <220>

35   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (34)..(34)  
       <223> X= S, N o R
- <220>

40   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (37)..(37)  
       <223> X= V o I
- <220>

45   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (39)..(39)  
       <223> X= A o T
- <220>

50   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (41)..(41)  
       <223> X= K, Q o N
- <220>

55   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (48)..(48)  
       <223> X= Q, G, R, H o E
- <220>

60   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (51)..(51)  
       <223> X= S o L
- <220>

65   <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (52)..(52)

- <223> X= L, Q o H

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (54)..(54)

<223> X= S, F o Y
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (55)..(55)

<223> X= G, K, S, N o R
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (56)..(56)

<223> X= D, H, S o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (57)..(57)

<223> X= A, H, M, E, G, S o T
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (58)..(58)

<223> X= S, V, P, T, N o D
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (59)..(59)

<223> X= I o L
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (60)..(60)

<223> X= H, S, K, N, Y o E
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

40 <222> (61)..(61)

<223> X= D o E
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

45 <222> (62)..(62)

<223> X= T, I o A
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

50 <222> (63)..(63)

<223> X= V o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

55 <222> (64)..(64)

<223> X= E, T, Q, R o K
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

60 <222> (66)..(66)

<223> X= L o v
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

65 <222> (67)..(67)

<223> X= I, T o L

- 5     <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (68)..(68)  
       <223> X=I, M, F, Y o L
- 10    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (72)..(72)  
       <223> X= N, T, R, D o S
- 15    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (73)..(73)  
       <223> X= S, N, R, T o I
- 20    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (75)..(75)  
       <223> X= S o N
- 25    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (76)..(76)  
       <223> X= S o A
- 30    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (77)..(77)  
       <223> X= N, I o K
- 35    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (78)..(78)  
       <223> X= G, E o K
- 40    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (79)..(79)  
       <223> X= N, Y, D o T
- 45    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (80)..(80)  
       <223> X= V, K o I
- 50    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (81)..(81)  
       <223> X= T, A o I
- 55    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (83)..(83)  
       <223> X= S, L o T
- 60    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (87)..(87)  
       <223> X= E o V
- 65    <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (93)..(93)  
       <223> X= E o K

ES 2 807 758 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (94)..(94)  
 <223> X= K o R

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (95)..(95)  
 <223> X= N, T o S

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (96)..(96)  
 <223> X= I o F

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(97)  
 <223> X= K, N, A, o T

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (101)..(101)  
 <223> X= Q, K o E

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (104)..(104)  
 <223> X= V, I o K

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (105)..(105)  
 <223> X= H o R

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (112)..(112)  
 <223> X= N o Y

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (113)..(113)  
 <223> X= T, S, P, L o A

45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (114)..(114)  
 <223> X= S o P

50

<400> 1

Xaa Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa His Xaa Asp Xaa Thr Leu Tyr Thr Xaa Ser Xaa Xaa His  
 20 25 30

# ES 2 807 758 T3

Pro Xaa Cys Lys Xaa Thr Xaa Met Xaa Cys Phe Leu Leu Glu Leu Xaa  
           35                                  40                                  45

Val Ile Xaa Xaa Glu Xaa  
       50                                  55                                  60

Asn Xaa Xaa Xaa Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
   65                                  70                                  75                                  80

Xaa Glu Xaa Gly Cys Lys Xaa Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa  
                   85                                  90                                  95

Xaa Glu Phe Leu Xaa Ser Phe Xaa Xaa Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa  
                   100                                  105                                  110

Xaa Xaa

<210> 2

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de interleucina 15 de primate

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = N o I

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X = N o D

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X = K o R

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X = K o R

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X = E o Q

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X = I o T

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> X = M o I

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> X = D o G

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> X = V o I  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (34)..(34)  
 <223> X = S o R  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (52)..(52)  
 <223> X = L o H  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X = G o N  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (56)..(56)  
 <223> X = D o N  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (57)..(57)  
 <223> X = A o T  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (58)..(58)  
 <223> X = S, N o D  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (60)..(60)  
 <223> X = H o N  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (63)..(63)  
 <223> X = V o I  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (67)..(67)  
 <223> X = I o L  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X = N o R  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (73)..(73)  
 <223> X = S o I  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (76)..(76)  
 <223> X = S o A  
 65  
 <220>

ES 2 807 758 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (79)..(79)  
 <223> X=N o T

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (80)..(80)  
 <223> X=V o I

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (93)..(93)  
 <223> X=E o K

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (112)..(112)  
 <223> X=N o Y

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (113)..(113)  
 <223> X=T o A

25 <400> 2

Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ser xaa His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Xaa Xaa His  
 20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
 35 40 45

Val Ile Ser Xaa Glu Ser xaa xaa xaa xaa Ile xaa Asp Thr Xaa Glu  
 50 55 60

Asn Leu Xaa Ile Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Ser Xaa Asn Gly Xaa Xaa  
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile  
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa  
 100 105 110

Xaa Ser

30 <210> 3  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (93)..(93)  
 <223> X=E o K

40 <400> 3

ES 2 807 758 T3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
 1 5 10 15  
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
 20 25 30  
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
 35 40 45  
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
 50 55 60  
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
 65 70 75 80  
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile  
 85 90 95  
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
 100 105 110

Thr Ser

- <210> 4
- <211> 61
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de consenso de dominio sushi de mamifero
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> X= P o A
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- <223> X= M o V
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X= V o I
- 25 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> X= W, R o Q
- 30 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (16)..(16)
- <223> X= S o N
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (19)..(19)
- <223> X= L o V
- 40 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (20)..(20)
- <223> X= Y, H o N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(26)  
 5 <223> X= I o V

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 10 <223> X= S o T

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 15 <223> X=T o I

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (45)..(45)  
 20 <223> X=T o I

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (45)..(45)  
 25 <223> X= L o I

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (48)..(48)  
 30 <223> X= A o N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(51)  
 35 <223> X= V o A

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (53)..(53)  
 40 <223> X= H o Y

<400> 4

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Xaa  
 1 5 10 15

Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn Lys Xaa  
 35 40 45

45 Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

<210> 5  
 <211> 64  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de consenso de dominio sushi de mamífero ampliada

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)

- <223> X= T, V o I

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5     <222> (5)..(5)

<223> X= P o A
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

10    <222> (7)..(7)

<223> X= M o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

15    <222> (9)..(9)

<223> X= V o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

20    <222> (15)..(15)

<223> X= W, R o Q
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

25    <222> (18)..(18)

<223> X= S o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

30    <222> (21)..(21)

<223> X=L o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

35    <222> (22)..(22)

<223> X=Y, H o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

40    <222> (28)..(28)

<223> X= I o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

45    <222> (41)..(41)

<223> X= S o T
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

50    <222> (43)..(43)

<223> X= T o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

55    <222> (47)..(47)

<223> X= L o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

60    <222> (50)..(50)

<223> X= A o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

65    <222> (53)..(53)

<223> X= V o A

ES 2 807 758 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (55)..(55)  
 5 <223> X= H o Y  
  
 <400> 5  
  
 Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15  
  
 Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30  
  
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn  
 35 40 45  
  
 Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60  
 10  
 <210> 6  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> secuencia de consenso de dominio sushi de primate  
  
 <220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= P o A  
  
 <220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= M o V  
  
 <220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X= W, R o Q  
  
 <220>  
 35 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> X= Y o H  
  
 <220>  
 40 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(26)  
 <223> X= I o V  
  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(51)  
 <223> X= V o A  
  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (53)..(53)  
 <223> X= V o A  
  
 <400> 6  
 55

# ES 2 807 758 T3

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser  
 1 5 10 15

Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala  
 35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

- <210> 7
- <211> 63
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> secuencia de consenso de dominio sushi de primate ampliada
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> X= V o I
- 15
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- <223> X= P o A
- 20
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X= M o V
- 25
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (15)..(15)
- <223> X= W, R o Q
- 30
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (22)..(22)
- <223> X= Y o H
- 35
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (28)..(28)
- <223> X= I o V
- 40
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (53)..(53)
- <223> X=V o A
- 45
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (55)..(55)
- <223> X=H o Y
- 50
- <400> 7

ES 2 807 758 T3

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
50 55 60

<210> 8

<211> 61

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser  
1 5 10 15

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala  
35 40 45

10 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
50 55 60

<210> 9

<211> 64

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

20 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
50 55 60

<210> 10

<211> 77

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> secuencia de consenso de dominios sushi y bisagra de mamífero

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X= T, V o I

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

- <223> X= P o A

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (7)..(7)

<223> X= M o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (9)..(9)

<223> X= V o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (15)..(15)

<223> X= W, R o Q
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (18)..(18)

<223> X= S o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (21)..(21)

<223> X= L o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (22)..(22)

<223> X= Y, H o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (28)..(28)

<223> X= I o V
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

40 <222> (41)..(41)

<223> X= S o T
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

45 <222> (43)..(43)

<223> X= T o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

50 <222> (47)..(47)

<223> X= L o I
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

55 <222> (50)..(50)

<223> X=A o N
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

60 <222> (53)..(53)

<223> X= V o A
- <220>

<221> MISC\_FEATURE

65 <222> (55)..(55)

<223> X= H o Y

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (55)..(55)  
 5 <223> X= H o Y

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (68)..(68)  
 10 <223> X=A, S o L

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (70)..(70)  
 15 <223> X= V, A, S o T

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (71)..(71)  
 20 <223> X= H o R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 25 <223> X= Q o H

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (73)..(73)  
 30 <223> X= R, S o K

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (75)..(75)  
 35 <223> X= A, V o P

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (76)..(76)  
 40 <223> X= P o S

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (77)..(77)  
 45 <223> X= P o T

<400> 10

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn  
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa  
 65 70 75

50 <210> 11  
 <211> 77  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de dominios sushi y bisagra de primate

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X= V o I

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X= P o A

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X= M o V

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X= W, R o Q

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X= Y o H

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X= I o V

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> X= V o A

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> X= H o Y

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> X= A, S o L

50

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> X= V, A o T

55

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (71)..(71)

<223> X= H o R

60

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> X= A o V

65

<400> 11

ES 2 807 758 T3

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Gln Arg Pro Xaa Pro Pro  
65 70 75

<210> 12  
<211> 77  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro  
65 70 75

<210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ligador peptídico

<400> 13

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln  
20

<210> 14  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ligador peptídico

<400> 14

ES 2 807 758 T3

ser Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly ser Gly Gly  
20

<210> 15

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ligador peptídico

<400> 15

ser Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Gln  
20

15 <210> 16

<211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> RL12

<400> 16

ES 2 807 758 T3

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

<210> 17  
 <211> 211  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> RLI1

10 <400> 17

ES 2 807 758 T3

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly  
65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu  
85 90 95

Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu  
100 105 110

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val  
115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu  
130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val  
145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn  
165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn  
180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile  
195 200 205

Asn Thr Ser  
210

## REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una composición que comprende conjugados monoméricos a partir de una muestra, comprendiendo dicho conjugado:
  - a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15, y
  - b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R $\alpha$ ;
 en el que dicho conjugado tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17,
   
 en el que dicho método comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) realizada a un pH igual a o mayor de 7,0,
   
 seguido por una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en dicha muestra llevada a cabo en una disolución de tampón que contiene una sal de amonio,
   
 en el que dicha muestra corresponde a una muestra de un medio de cultivo de una célula huésped transformada que expresa el conjugado, correspondiendo dicha célula huésped a una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende células CHO, células HEK293, células COS, células PER.C6®, células SP20, células NSO o cualquier célula derivada de las mismas, preferiblemente células CHO.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende las etapas de:
  - a) someter la muestra a cromatografía de AEX para producir un primer eluato; y
  - b) someter el primer eluato a cromatografía de HIC para producir un segundo eluato.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la etapa a) de cromatografía de AEX se realiza usando una columna o resina de AEX seleccionada del grupo que comprende Q Sepharose, tal como Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose XL, Q Sepharose big beads, Q sepharose high performance, Q sepharose XL; DEAE Sephadex A-25, DEAE Sephadex A-50, QAE Sephadex A-25, QAE Sephadex A-50, Sourse 15Q, Sourse 30Q, Resourse Q, Capto Q, Capto DEAE, Mono Q, Toyopearl Super Q, Toyopearl DEAE, Toyopearl QAE, Toyopearl Q, Toyopearl GigaCap Q, TSKgel SuperQ, TSKgel DEAE, Fractogel EMD TMAE, Fractogel EMD TMAE HiCap, Fractogel EMD DEAE, Fractogel EMD DMAE, Macroprep High Q, Macro-prep-DEAE, Unosphere Q, Nuvia Q, POROS HQ, POROS PI, DEAE Ceramic HyperD, Q Ceramic HyperD, DEAE Sepharose Fast Flow y ANX Sepharose 4 Fast Flow.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que para la etapa a) de someter la muestra a cromatografía de AEX, la etapa de carga se lleva a cabo en una disolución de tampón que tiene un pH igual a o mayor de 7,5.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de elución de la cromatografía de AEX se lleva a cabo en un gradiente que usa tampón salino de NaCl desde 1 hasta 0 M, preferiblemente NaCl desde 0,75 hasta 0 M.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que para la etapa b) de someter la muestra a cromatografía de HIC, la etapa de carga se realiza mezclando el primer eluato con el tampón de carga directamente en dicha cromatografía.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la disolución de tampón que contiene una sal de amonio comprende sulfato de amonio de 0,75 M a 2,5 M, preferiblemente sulfato de amonio de 1 M a 2 M, y lo más preferiblemente sulfato de amonio de 1,5 a 2 M.
8. Método según una cualquiera de la reivindicación 7, en el que el sulfato de amonio se mezcla directamente con el primer eluato en la columna o resina de cromatografía de HIC.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho método comprende además la etapa de usar el conjugado obtenido para la preparación de un medicamento.
10. Composición farmacéutica que puede obtenerse mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicha composición al menos el 80% de conjugados monoméricos, teniendo dichos conjugados una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

11. Composición según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de un trastorno oncológico en un sujeto.

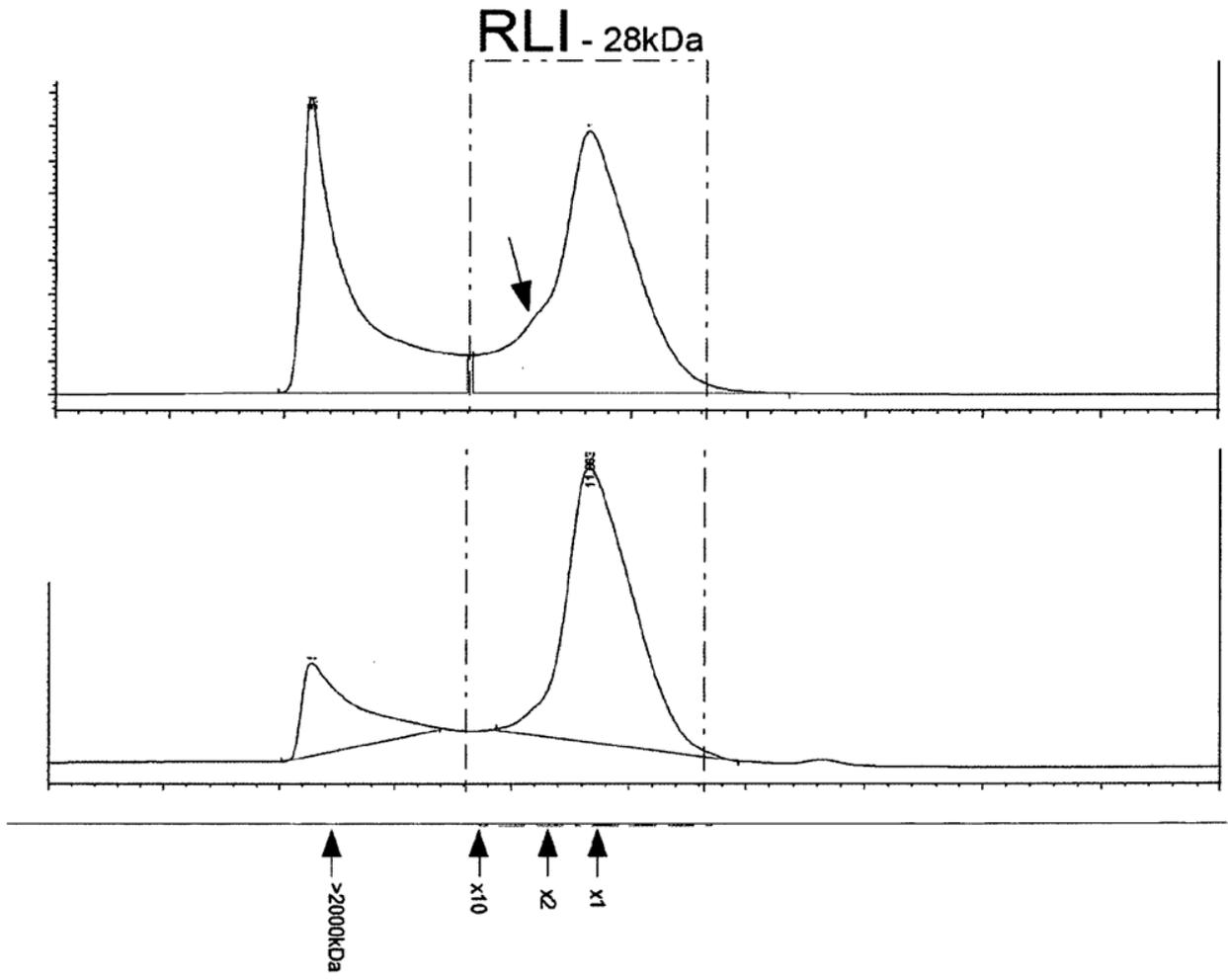


Figura 1

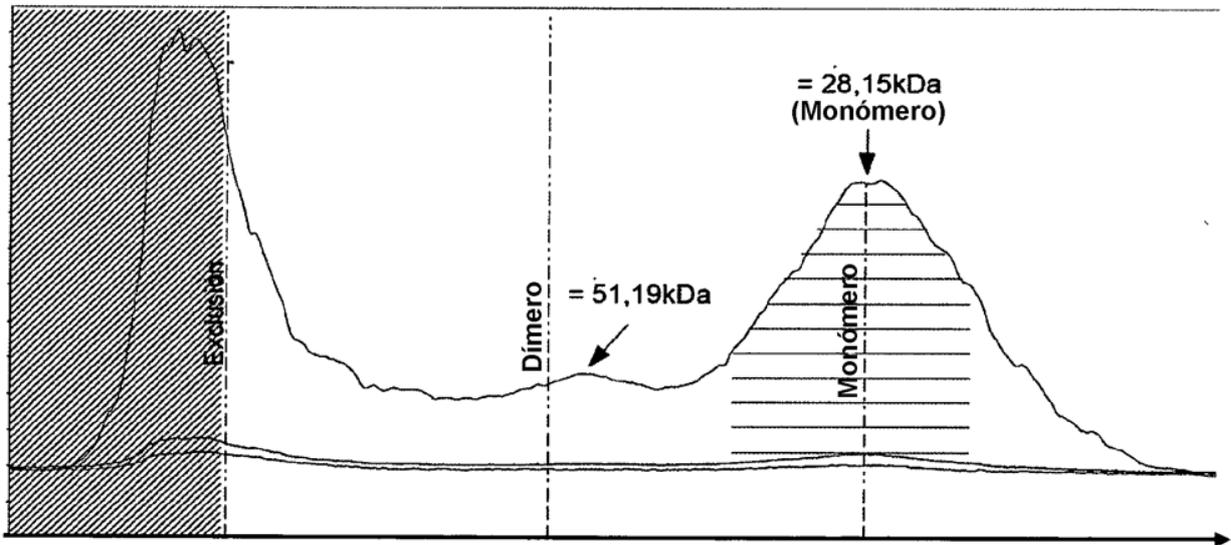


Figura 2

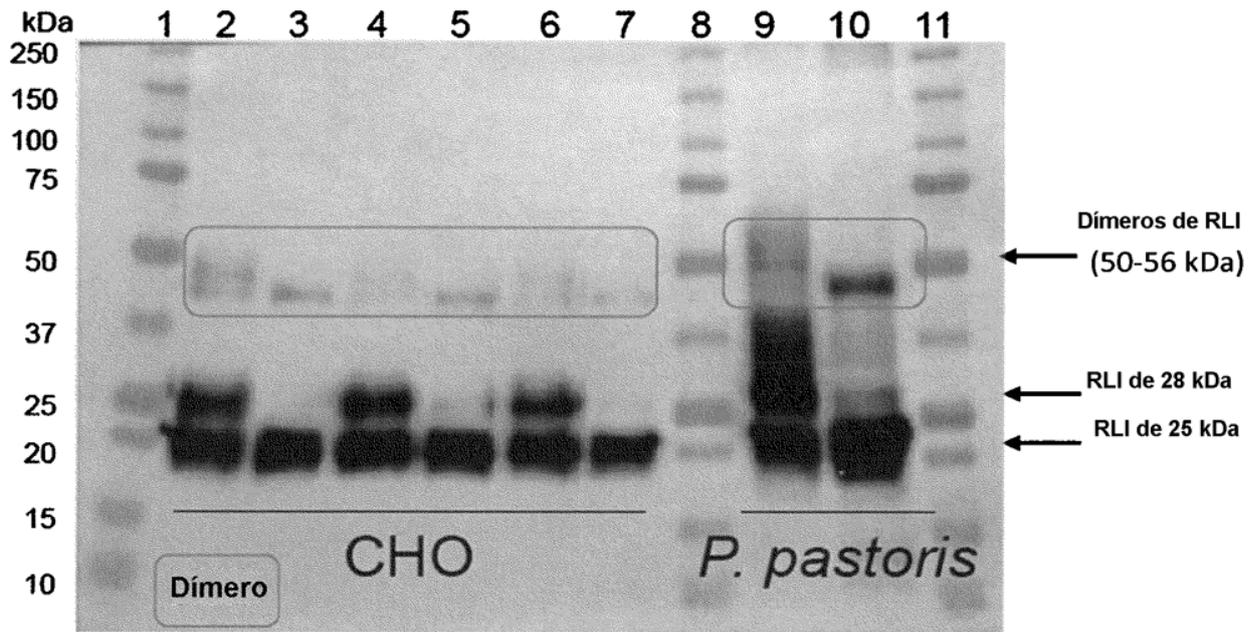


Figura 3

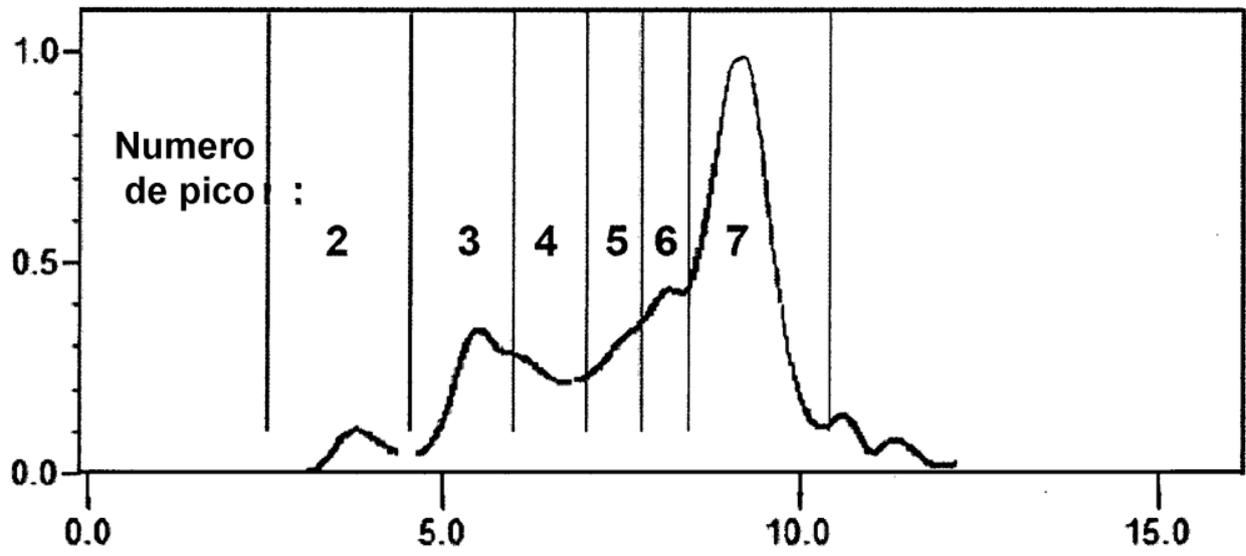


Figura 4

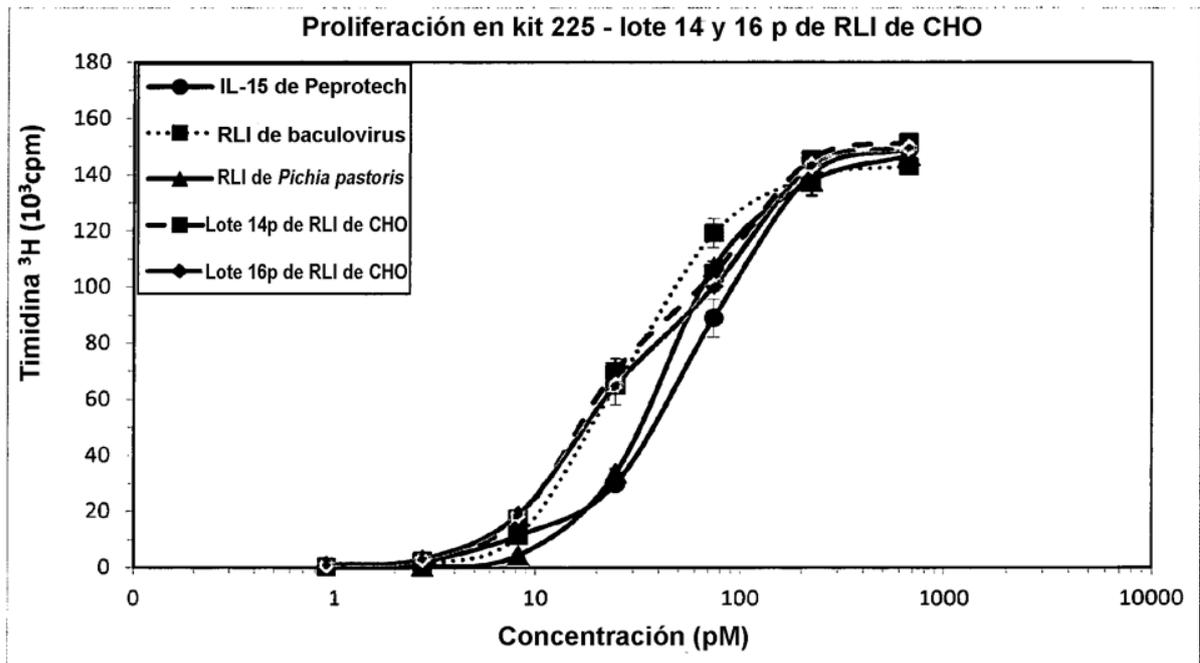


Figura 5

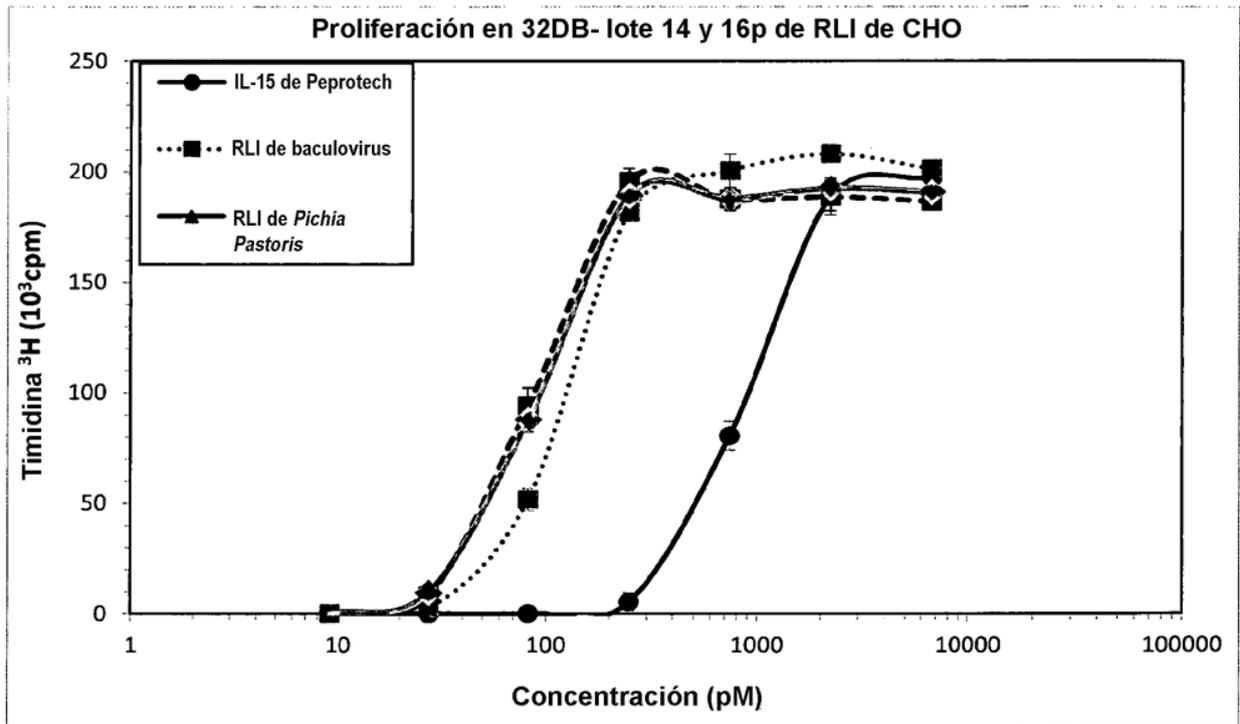


Figura 6

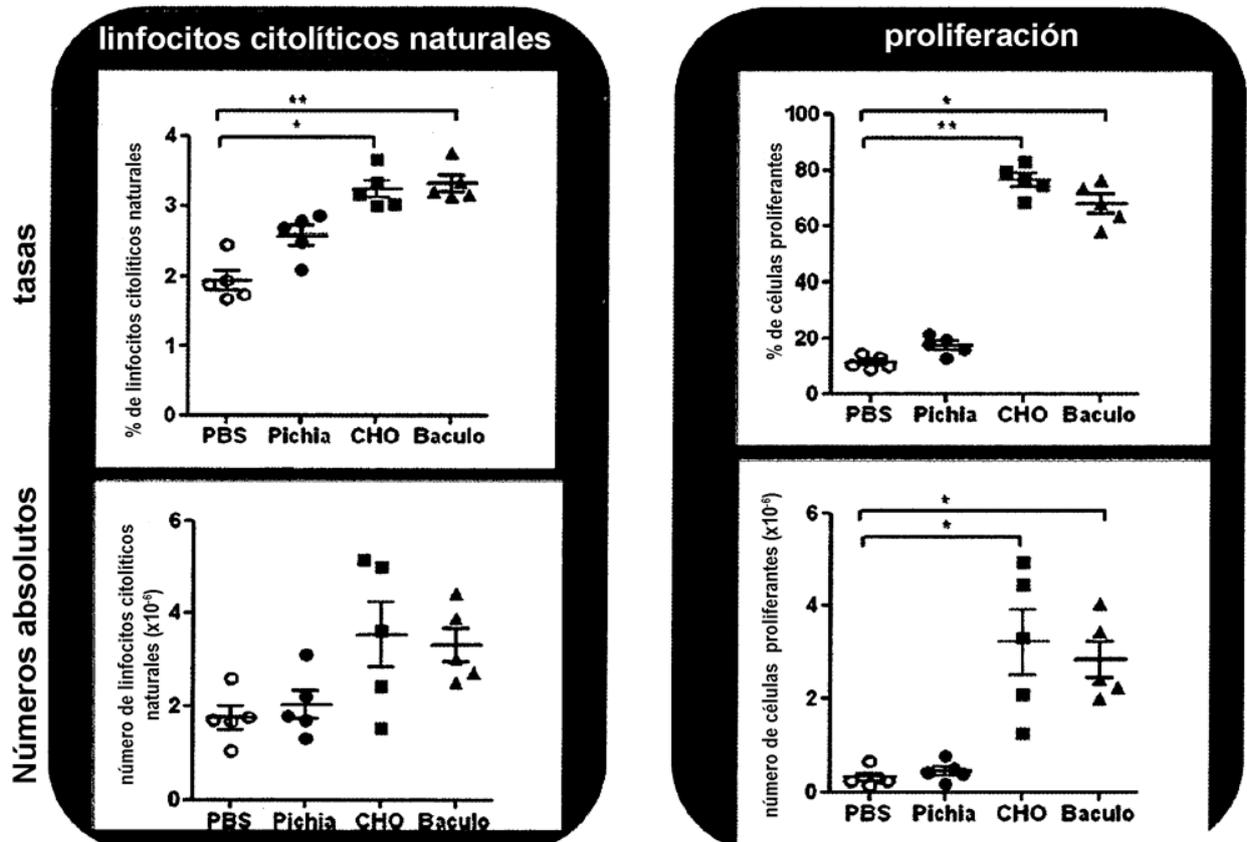


Figura 7