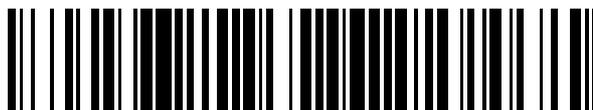


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 235**

51 Int. Cl.:
C07K 1/113 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02725004 .2**
96 Fecha de presentación: **22.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1366062**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **RECUPERACIÓN EFICAZ DE PROTEÍNAS REPLEGADAS CORRECTAMENTE.**

30 Prioridad:
23.02.2001 US 271033 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
Immunex Corporation
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:
SASSENFELD, Helmut, M.;
REMMELE, Richard, L., Jr. y
McCOY, Rebecca, E.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 370 235 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

Recuperación eficaz de proteínas replegadas correctamente.

5 Campo de la invención

[0001] La invención pertenece al campo de tratamiento y purificación de proteínas.

Antecedentes

10

[0002] Se han conseguido altos niveles de expresión de muchas proteínas de origen eucariota en hospedadores de expresión procariotas. Dichas proteínas eucariotas con frecuencia no se pliegan y se acumulan como cuerpos de inclusión insolubles en el hospedador procariota. Para obtener proteínas biológicamente activas, las proteínas atrapadas en los cuerpos de inclusión tienen que desplegarse y replegarse en condiciones rigurosas que incluyen

15

[0003] La expresión de proteínas de origen eucariota en hospedadores eucariotas evitaba estos problemas. Siempre que el vector de expresión se diseñara apropiadamente (por ejemplo, con péptidos señal de secreción, etc.), las líneas celulares eucariotas tendían a procesarse correctamente y secretar proteínas eucariotas extracelulares como productos solubles.

20

[0004] La Solicitud de Patente Internacional publicada como documento WO 96/03141 A1 desvela proteínas quiméricas receptor de TNF:Fc que se expresan en células CHO y se purifican por medio de técnicas cromatográficas sin replegamiento.

25

[0005] La solicitud EP 0 293 785 describe la expresión de TGF- β 1 recombinante en células CHO. La solicitud EP 0 433 225 describe un proceso para la producción de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

30

[0006] La solicitud EP 0 553 494 se refiere a la producción de interferón alfa humano en levaduras, y la publicación de revista titulada "Purification and renaturation of Japanese encephalitis virus nonstructural glycoprotein NS1 overproduced by insect cells" ("Purificación y renaturalización de la glicoproteína no estructural del virus de la encefalitis japonesa NS1 sobreproducida por células de insecto") (Flamand et al., Protein Expression and Purification 6, 519-527, 1995) describe la proteína NS1 aislada a partir de células de insecto.

35

[0007] Sin embargo, a medida que los sistemas de expresión y los vectores han mejorado para maximizar los niveles de expresión a partir de hospedadores eucariotas, no todas las proteínas recombinantes expresadas y secretadas a partir de estos hospedadores están en la conformación más activa deseada. La invención está diseñada para solucionar dichos problemas de expresión y maximizar rendimientos de proteínas biológicamente

40

Sumario de la invención

[0008] La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que no toda la preparación de proteínas recombinantes que son expresadas por células hospedadoras eucariotas se pliega en una conformación terciaria nativa. Además, se ha descubierto que ciertas regiones o dominios de proteínas recombinantes pueden plegarse de forma apropiada, mientras que otras regiones o dominios pueden tener conformaciones indeseadas. Por consiguiente, la invención se refiere a un método para promover una conformación deseada de una forma soluble recombinante glicosilada de un receptor de TNF que ha sido secretado por una célula de mamífero, comprendiendo el método poner en contacto una preparación de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF que contiene una mezcla de al menos dos isómeros configuracionales de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación, que es una fuente de un agente reductor, durante un tiempo suficiente para aumentar la proporción relativa del isómero configuracional deseado, y determinar la proporción relativa del isómero configuracional deseado en la mezcla, donde el isómero configuracional deseado tiene una mayor afinidad de unión que un isómero configuracional indeseado por un ligando afín del receptor de TNF. AKO descrito en el presente documento es un método para poner en contacto una preparación de la proteína recombinante que contiene una mezcla de al menos dos isómeros de la proteína recombinante con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación durante un tiempo suficiente para aumentar la proporción relativa del isómero conformacional deseado y determinar la proporción relativa del isómero conformacional deseado en la mezcla. Otro aspecto descrito en la presente memoria es un método que incluye poner en contacto una preparación de una proteína recombinante que ha sido producida por células de mamífero con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación, a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, y aislar una fracción de la preparación de la proteína recombinante con una conformación deseada. Las proteínas recombinantes preferidas son proteínas recombinantes glicosiladas tales como, por ejemplo, las producidas por células eucariotas. También se describen

65

producidas por los métodos de la invención.

Breve descripción de las figuras

5 [0009]

Figura 1. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de TNFR:Fc. Esta preparación de TNFR:Fc eluye durante HIC como tres picos característicos recogidos en la Fracción N° 2 y Fracción N° 3, como se indica.

10 Figura 2. Análisis de Dicroísmo Circular de Fracciones N° 2 y N° 3. En la Figura 2 se muestran mediciones de Dicroísmo Circular UV Cercano expresadas en términos de elipticidad media de residuos. La Figura 2A presenta los datos espectrales; la línea para la Fracción N° 3 es la más próxima a la flecha, destacando el desplazamiento negativo a aproximadamente 270 nM atribuido a las contribuciones disulfuro, y la línea para la Fracción N° 2 es la línea continua más oscura. La Figura 2B presenta los datos de ajuste a la curva para la Fracción N° 2 (línea de trazos pequeña) y la Fracción N° 3 (línea de trazos mayor).

15 Figura 3. Determinación de Peso Molecular Usando cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) en línea, dispersión de luz (LS), ultravioleta (UV), y detección del índice de refracción (RI) en serie (SEC en línea/UV/LS/RI). La Figura 3A es la Fracción N° 3 y la Figura 3B la Fracción N° 2. Las líneas de trazos verticales indican cuando en los cortes se evaluó la determinación del peso molecular en la región que rodeaba al pico principal.

20 Figura 4. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido de las Fracciones N° 2 y N° 3. La Figura 4A corresponde a los datos sin corregir y la Figura 4B presenta los datos corregidos con respecto al punto basal. Las transiciones térmicas de fusión están marcadas por líneas de trazos verticales. Las flechas indican un desplazamiento de entalpía. Las líneas de puntos horizontales en la Figura 4B se usan como referencia basal.

25 Figura 5. Correlación de Fracción N° 2 y Actividad de Unión. Se ensayaron seis preparaciones diferentes de TNFR:Fc (denominadas A a F), de seis líneas celulares diferentes, con respecto a la correlación entre el porcentaje de aumento en proporción de Fracción N° 2 (rombos oscuros) y porcentaje de aumento en Unidades de Unión a TNF alfa (rombos claros).

30 Figura 6. Efecto de Variación de la Concentración de Cisteína sobre la Conversión de la Fracción N° 3 en Fracción N° 2. Se trataron muestras de proteína con diversas concentraciones de cisteína (0,25-5,0 mM) y se evaluaron los cambios en la Fracción N° 3 usando HIC. Se trataron cuatro lotes diferentes de TNFR:Fc durante 18 horas a la concentración de cisteína indicada en el eje x. El porcentaje de Fracción N° 3 en cada lote que se convirtió en Fracción N° 2 se representa en el eje y.

35 Figura 7. Efecto de la Concentración de Cisteína sobre la Proporción de Fracción N° 3. Se trataron muestras de proteína de cuatro lotes diferentes con diversas concentraciones de cisteína (0-50 mM) y el nivel resultante de Fracción N° 3 se evaluó por HIC.

40 Figura 8. Efecto de la Temperatura sobre Intercambio de Disulfuro. Se trataron fracciones de proteína a temperatura ambiente o a 4 grados C en presencia o ausencia de cobre durante diversos tiempos. La Figura 8A presenta cambios en la Fracción N° 3 de HIC después de 6 horas y la Figura 8B presenta cambios en la Fracción N° 3 de HIC después de 18 horas.

Descripción detallada de la invención

45 [0010] En la presente memoria se describen métodos para aumentar la recuperación de proteínas recombinantes activas. En particular, se describen métodos para promover una conformación deseada de una proteína en preparaciones de una proteína recombinante. Significativamente, se describen métodos suaves para alterar la estructura de las proteínas sin necesitar el uso de tratamientos rigurosos con caótopos (tales como, por ejemplo, desnaturizantes fuertes tales como SDS, clorhidrato de guanidinio o urea). El uso de estos métodos en preparaciones de proteínas recombinantes da como resultado un mayor porcentaje, o una mayor fracción relativa, 50 de la proteína recombinante en la preparación con una conformación deseada. Una conformación deseada para una proteína recombinante es la estructura tridimensional de una proteína que se parece más, y/o duplica la función del dominio natural de esa proteína. Dichos métodos suaves son particularmente ventajosos cuando la proteína recombinante está destinada a usarse *in vivo* como un fármaco o agente biológico.

55 [0011] En general, cuando la proteína recombinante contiene un dominio de una proteína receptora, la conformación deseada tendrá una mayor afinidad de unión (y, por consiguiente, una menor constante de disociación) para un ligando afín del receptor. En este contexto, la presente invención se refiere específicamente a formas solubles recombinantes glicosiladas del receptor de TNF, de forma que su conformación deseada tendrá una mayor afinidad de unión y una menor constante de disociación para el TNF (por ejemplo, TNF-alfa).

60 [0012] Además, la conformación deseada de una proteína recombinante preferentemente es más termoestable que una conformación indeseada (medida en el mismo medio de solución). La termoestabilidad puede medirse de cualquiera de varias formas tales como, por ejemplo, la transición de temperatura de fusión (T_m). La conformación deseada de una proteína recombinante puede tener o no una disposición diferente de enlaces disulfuro, aunque 65 preferentemente la conformación contiene enlaces disulfuro nativos. La conformación deseada de una proteína

recombinante puede tener otras características de estructura terciaria. Por ejemplo, una conformación deseada puede ser un monómero, dímero, trímero, tetrámero o alguna otra forma de orden superior de la proteína. Para los fines de la invención, la "conformación" de una proteína es su estructura tridimensional. Dos estructuras diferentes de un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos primaria son "conformómeros" entre sí cuando tienen diferentes conformaciones correspondientes a un mínimo de energía, y difieren entre sí únicamente en la forma en la que se orientan sus átomos en el espacio. Los conformómeros pueden interconvertirse (lo cual se refiere a la libertad rotacional alrededor de enlaces sin que se rompan los enlaces). Dos estructuras diferentes de un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos primaria son "isómeros configuracionales" cuando tienen diferentes conformaciones correspondientes a un mínimo de energía, difieren entre sí en la manera en la que se orientan sus átomos en el espacio, y no son interconvertibles sin la ruptura de un enlace covalente. En la práctica de la invención, los isómeros configuracionales pueden interconvertirse, por ejemplo, por ruptura y opcionalmente nueva formación de enlaces disulfuro.

[0013] De esta manera, un aspecto descrito en la presente memoria implica poner en contacto una preparación de la proteína recombinante glicosilada que contiene una mezcla de al menos dos isómeros configuracionales de la proteína recombinante con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación durante un tiempo suficiente para aumentar la proporción relativa del isómero configuracional deseado y determinar la proporción relativa del isómero configuracional deseado en la mezcla. Otro aspecto implica poner en contacto una preparación de una proteína recombinante que ha sido producida por células de mamífero con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación, a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, y aislar una fracción de la preparación de la proteína recombinante con una conformación deseada. Las proteínas recombinantes preferidas son proteínas recombinantes glicosiladas, tales como, por ejemplo, las producidas por células eucariotas.

[0014] Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar aproximadamente cualquier proteína para promover una conformación deseada. Generalmente se entiende que una proteína es un polipéptido de al menos aproximadamente 10 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 25 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75 aminoácidos y aún más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos. Los métodos encuentran una utilidad particular en el tratamiento de proteínas que tienen al menos aproximadamente 3 residuos de cisteína, más preferentemente al menos aproximadamente 8 residuos de cisteína, aún más preferentemente al menos aproximadamente 15 residuos de cisteína, incluso aún más preferentemente al menos aproximadamente 30, y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 50 a 150 residuos de cisteína.

[0015] En general, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para mejorar procesos de producción de proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes son proteínas producidas por el proceso de ingeniería genética. La expresión "ingeniería genética" se refiere a cualquier método de ADN o ARN recombinante usado para crear una célula hospedadora que exprese un gen a niveles elevados, a niveles reducidos y/o una forma mutante del gen. En otras palabras, la célula se ha transfectado, transformado o transducido con una molécula de polinucleótido recombinante, y por lo tanto se ha alterado para hacer que la célula altere la expresión de una proteína deseada. Los expertos en la materia conocen bien métodos y vectores para modificar por ingeniería genética células y/o líneas celulares para expresar una proteína de interés; por ejemplo, se ilustran varias técnicas en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, y actualizaciones trimestrales) y *Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989). Las técnicas de ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, vectores de expresión, recombinación homóloga dirigida y activación génica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.272.071 de Chappel) y transactivación por factores de transcripción modificados por ingeniería genética (véase, por ejemplo, Segal et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96(6):2758-63).

[0016] Los métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria encuentran una utilidad particular para mejorar la producción de proteínas que están glicosiladas. Específicamente, se glicosilarán proteínas que se secretan por sistemas de células fúngicas (por ejemplo, levaduras, hongos filamentosos) y sistemas de células de mamífero. Preferentemente, las proteínas son secretadas por células de producción de mamífero adaptadas al crecimiento en cultivos celulares. Los ejemplos de dichas células usadas comúnmente en la industria son células CHO, VERO, BHK, HeLa, CV 1 (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, líneas celulares de mieloma (especialmente murinas), PC12 y WI38. Son células hospedadoras particularmente preferidas células de ovario de hámster Chino (CHO), que se usan ampliamente para la producción de varias proteínas recombinantes complejas, por ejemplo, citocinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel et al., 1996, *Blood* 88: 2004-2012; Kaufman et al., 1988, *J. Biol Chem* 263: 6352-6362; McKinnon et al., 1991, *J Mol Endocrinol* 6: 231-239; Wood et al., 1990, *J. Immunol* 145: 3011-3016). La línea celular mutante deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub et al., 1980, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220), DXB11 y DG-44 son las líneas de células hospedadoras CHO elegidas porque el eficaz sistema de expresión génica seleccionable y amplificable de DHFR permite un alto nivel de expresión de proteína recombinantes en estas células (Kaufman R. J., 1990, *Meth Enzymol* 185: 527-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o de suspensión y presentan una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas recombinantes expresadas en ellas se han caracterizado ampliamente y se han aprobado para uso en la fabricación clínica por agencias reguladoras.

[0017] Se ha descubierto que el método descrito y/o reivindicado en la presente memoria es un proceso suave y eficaz para mejorar el proceso de producción de proteínas que pueden adoptar múltiples conformaciones y/o contener más de un dominio. Un "dominio" es una región contigua de la cadena polipeptídica que adopta una estructura terciaria particular y/o tiene una actividad particular que puede localizarse en esa región de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, un dominio de una proteína puede tener afinidad de unión por un ligando, y un dominio de una proteína puede tener afinidad de unión por otro ligando. En un sentido termoestable, un dominio puede referirse a una unidad de desplegamiento cooperativo de una proteína. Dichas proteínas que contienen más de un dominio pueden encontrarse de forma natural como una proteína o modificarse genéticamente como una proteína de fusión. Además, los dominios de un polipéptido pueden tener subdominios.

[0018] En un aspecto, los métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria pueden usarse en preparaciones de proteínas recombinantes en las que al menos un dominio de la proteína tiene una conformación estable, y al menos un dominio de la proteína tiene una conformación inestable. Los términos "estable" e "inestable" se usan como términos relativos. El dominio de la proteína con una conformación estable tendrá, por ejemplo, una mayor temperatura de fusión (T_m) que el dominio inestable de la proteína cuando se mide en la misma solución. Un dominio es estable en comparación con otro dominio cuando la diferencia en la T_m es de al menos aproximadamente 2 °C, más preferentemente aproximadamente 4 °C, aún más preferentemente aproximadamente 7 °C, aún más preferentemente aproximadamente 10 °C, incluso más preferentemente aproximadamente 15 °C, aún más preferentemente aproximadamente 20 °C, incluso más preferentemente aproximadamente 25 °C y aún más preferentemente aproximadamente 30 °C, cuando se miden en la misma solución.

[0019] El método descrito y/o reivindicado en la presente memoria también se puede aplicar generalmente a proteínas que tienen un dominio Fc, y otro dominio (por ejemplo, anticuerpos y proteínas de fusión Fc). Por ejemplo, en una de las realizaciones no limitantes ilustradas a continuación, TNFR:Fc, los valores de T_m para la parte Fc de la molécula son de 69,1 °C y 83,4 °C, mientras que la T_m para la parte TNFR de la molécula varía de 52,5 °C (en la conformación más deseada) a una T_m de 49,7 °C (en la conformación menos deseada).

[0020] Las proteínas particularmente preferidas son fármacos basados en proteínas, también conocidos como agentes biológicos. Preferentemente, las proteínas se expresan como productos extracelulares. Las proteínas que pueden producirse usando los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, un ligando flt3 (como se describe en el documento WO 94/28391), un ligando CD40 (como se describe en el documento US 6.087.329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, ligando Fas, ligando para el activador del receptor de NF-kappa B (RANKL), ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, como se describe en el documento WO 97/01633), linfopoyetina derivada de estroma tímico, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, como se describe en la Patente Australiana N° 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, RANTES, hormona de crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a insulina, hormona paratiroidea, interferones, factores de crecimiento nerviosos, glucagón, interleucinas 1 a 18, factores estimuladores de colonias, linfotoxina- β , factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M y diversos ligandos de moléculas de la superficie celular ELK y Hek (tales como los ligandos de quinasas relacionadas con eph o LERKS). Pueden encontrarse descripciones de proteínas que pueden purificarse de acuerdo con los métodos de la invención, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. Vol. II (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); and The Cytokine Handbook (A.W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1991).

[0021] También pueden mejorarse preparaciones de los receptores, especialmente formas solubles de los receptores, para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente usando los métodos de la invención, incluyendo las dos formas de TNFR (denominadas p55 y p75), receptores de Interleucina-1 tipos I y II (como se describe en los documentos EP 0 460 846, US 4.968.607 y US 5.767.064), receptor de Interleucina-2, receptor de Interleucina-4 (como se describe en los documentos EP 0 367 566 y US 5.856.296), receptor de Interleucina-15, receptor de Interleucina-17, receptor de Interleucina-18, receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor del factor de estimulación de colonias de granulocitos, receptores para la oncostatina M y factor inhibidor de leucemia, activador del receptor de NF-kappa B (RANK, como se describe en el documento US 6.271.349), receptores de TRAIL (incluyendo receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4) y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o Receptor Inductor de Apoptosis (AIR).

[0022] Otras proteínas cuyos procesos de producción pueden mejorarse usando los métodos incluyen agrupamiento de antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD), por ejemplo, los descritos en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference; Kishimoto, Kikutani et al., eds.; Kobe, Japan, 1996), o moléculas CD descritas en trabajos posteriores. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen CD27, CD30, CD39, CD40; y ligandos de los mismos (ligando de CD27, ligando de CD30 y ligando de CD40). Varios de éstos son miembros de la familia del receptor de TNF, que también incluye 41BB y OX40; los ligandos con frecuencia son miembros de la familia del TNF (como lo son el ligando e 41BB y el ligando de OX40); por

consiguiente, también pueden producirse miembros de las familias del TNF y TNFR usando los métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria.

5 **[0023]** También pueden prepararse proteínas que son enzimáticamente activas. Los ejemplos incluyen miembros de la familia de metaloproteinasas-desintegrinas, diversas quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, actor de plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, enzima convertidora de TNF-alfa y otras numerosas enzimas. También pueden expresarse ligandos de proteínas enzimáticamente activas.

10

[0024] Las composiciones y métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria también son útiles para la preparación de otros tipos de proteínas recombinantes, incluyendo moléculas de inmunoglobulina o partes de las mismas, y anticuerpos quiméricos (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región constante humana acoplada a una región de unión a antígeno murina) o fragmentos de los mismos. Se conocen numerosas técnicas por las que puede manipularse el ADN que codifica moléculas de inmunoglobulina para producir ADN capaces de codificar proteínas recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos con mayor afinidad u otros polipéptidos basados en anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick et al., 1989, *Biotechnology* 7: 934-938; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332: 323-327; Roberts et al., 1987, *Nature* 328: 731-734; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239: 1534-1536; Chaudhary et al., 1989, *Nature* 339: 394-397). También pueden usarse preparaciones de anticuerpos completamente humanos (tales como los que se preparan usando animales transgénicos, y opcionalmente modificados adicionalmente *in vitro*), así como anticuerpos humanizados. El término anticuerpo humanizado también incluye anticuerpos monocatenarios. Véase, por ejemplo, Cabilly et al., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly et al., Patente Europea N° 0.125.023 B1; Boss et al., Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Boss et al., Patente Europea N° 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. et al., documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., Patente Europea N° 0.194.276 B1; Winter, Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Winter, Patente Europea N° 0.239.400 B1; Queen et al., Patente Europea N° 0 451 216 B1; y Padlan, E. A. et al., EP 0 519 596 A1. El método también puede usarse durante la preparación de conjugados que comprenden un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Dichas sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como enterotoxina de *Estafilococo*); isótopos de yodo (tales como yodo-125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como Cry5.5.18); y proteínas de inactivación de ribosomas (tales como bouganina, gelonina o saporina-S6).

[0025] Los ejemplos de anticuerpos o conjugados de anticuerpo/citotoxina o anticuerpo/luminóforo contemplados en la presente memoria incluyen los que reconocen cualquiera o una combinación de las proteínas descritas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, subunidades del receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, subunidades del receptor de IL-18, PDGF- β , VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, receptor de EGF, receptor de VEGF, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína asociada a tumor TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos asociados a tumores que están presentes a niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos o proteínas asociadas con cáncer expresadas en células cancerosas de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, pulmón y/o riñón, y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando de RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardiaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa-factor tisular), MHC-I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado con linfocitos T citotóxicos), receptor Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina, IFN- γ , Virus Sincitial Respiratorio, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

[0026] También pueden prepararse preparaciones de diversas proteínas de fusión usando los métodos descritos y/o reivindicados. Los ejemplos de dichas proteínas de fusión incluyen proteínas expresadas como una fusión con una parte de una molécula de inmunoglobulina, proteínas expresadas como proteínas de fusión con porción cremallera y nuevas proteínas polifuncionales tales como proteínas de fusión de una citocina y un factor de crecimiento (es decir, GM-CSF e IL-3, MGF e IL-3). Los documentos WO 93/08207 y WO 96/40918 describen la preparación de diversas formas oligoméricas solubles de una molécula denominada CD40L, que incluye una proteína de fusión de inmunoglobulina y una proteína de fusión de cremallera, respectivamente; las técnicas analizadas en dichos documentos son aplicables a otras proteínas. Cualquiera de las moléculas anteriores puede expresarse como una proteína de fusión incluyendo, pero sin limitación, el dominio extracelular de una molécula de receptor celular, una enzima, una hormona, una citocina, una parte de una molécula de inmunoglobulina, un dominio de cremallera y un epítomo.

[0027] La preparación de una proteína recombinante puede ser un sobrenadante de un cultivo celular o un extracto celular, pero preferentemente es una fracción parcialmente purificada del mismo. Por “parcialmente purificada” se entiende que se ha realizado algún procedimiento o varios procedimientos de fraccionamiento, pero que están presentes más especies de polipéptidos (al menos un 10%) que la conformación proteica o proteína deseada. Una de las ventajas de los métodos de la invención es que la preparación de proteína recombinante puede estar a una concentración bastante elevada. Los intervalos de concentración preferidos son de 0,1 a 20 mg/ml, más preferentemente de 0,5 a 15 mg/ml, y aún más preferentemente de 1 a 10 mg/ml.

[0028] La preparación de proteína recombinante puede prepararse inicialmente cultivando células hospedadoras recombinantes en condiciones de cultivo adecuadas para expresar el polipéptido. El polipéptido también puede expresarse como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas transgénicas, cabras, cerdos u ovejas que se caracterizan por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. El polipéptido expresado resultante después puede purificarse, o purificarse parcialmente, a partir de dicho cultivo o componente (por ejemplo, a partir del medio de cultivo o extractos celulares o fluido corporal) usando procesos conocidos. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir, pero sin limitación, una o más etapas de filtración, centrifugación, precipitación, separación de fases, purificación por afinidad, exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC; usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico), HPLC o alguna combinación de los anteriores.

[0029] Por ejemplo, la purificación del polipéptido puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán al polipéptido; una o más etapas de columna sobre dichas resinas de afinidad tales como concanavalina-agarosa A, heparina-toyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; una o más etapas que implican elución; y/o cromatografía de inmunoafinidad. El polipéptido puede expresarse en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como un polipéptido de fusión, tal como los del polipéptido de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX). Están disponibles en el mercado kits para la expresión y purificación de dichos polipéptidos de fusión en New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N. J.) e InVitrogen, respectivamente. El polipéptido puede marcarse con un epítipo y posteriormente purificarse usando un anticuerpo específico dirigido contra dicho epítipo. Uno de estos epítipos (FLAG®) está disponible comercialmente en Kodak (New Haven, Conn.). También es posible utilizar una columna de afinidad que comprenda un polipéptido de unión al polipéptido, tal como un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Otros tipos de etapas de purificación por afinidad pueden ser una columna de Proteína A o una columna de Proteína G, en las que los agentes de afinidad se unen a proteínas que contienen dominios Fc. Pueden retirarse polipéptidos de una columna de afinidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución de alta concentración de sal, y después dializarse en un tampón con una menor concentración de sal para su uso, o cambiando el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o pueden retirarse competitivamente usando el sustrato natural de la porción conafinidad. En una realización de la invención ilustrada más adelante, la preparación de proteína recombinante se ha purificado parcialmente sobre una columna de afinidad de Proteína A.

[0030] Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para preparar una preparación apropiada de una proteína recombinante para uso en los métodos de la invención, y/o para purificar adicionalmente el polipéptido recombinante después de poner en contacto la preparación de la proteína recombinante con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación. El polipéptido que carece sustancialmente de otros polipéptidos de mamífero se define como “polipéptido aislado”.

[0031] El polipéptido también puede producirse por síntesis química convencional conocida. Los expertos en la materia conocen métodos para construir polipéptidos por medios sintéticos. Las secuencias de polipéptido construidas sintéticamente pueden glicosilarse *in vitro*.

[0032] El grado deseado de pureza final depende del uso deseado del polipéptido. Se desea un grado de pureza relativamente elevado, por ejemplo, cuando el polipéptido se va a administrar *in vivo*. En dicho caso, los polipéptidos se purifican de tal forma que no puedan detectarse bandas de polipéptido correspondientes a otros polipéptidos tras el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Un experto en la materia pertinente reconocerá que pueden visualizarse múltiples bandas correspondientes al polipéptido por SDS-PAGE, gracias a la glicosilación diferencial, al procesamiento postraduccional diferencial y similares. Más preferentemente, el polipéptido de la invención se purifica hasta una homogeneidad sustancial, como se indica por una sola banda de polipéptido tras el análisis por SDS-PAGE. La banda de polipéptido puede visualizarse por tinción con plata, tinción con azul de Coomassie y/o (si el polipéptido está radiomarcado) por autorradiografía.

[0033] Por “poner en contacto” se entiende someter a y/o exponer a, en solución. La proteína o polipéptido puede ponerse en contacto mientras está unida a un soporte sólido (por ejemplo, una columna de afinidad o una matriz cromatográfica). Preferentemente, la solución está tamponada. Para maximizar el rendimiento de una proteína con una conformación deseada, el pH de la solución se elige para proteger la estabilidad de la proteína y para ser óptimo para el intercambio de disulfuro. En la práctica de la invención, el pH de la solución preferentemente no es

fuertemente ácido. De esta manera, los intervalos de pH preferidos son mayores de pH 5, preferentemente de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 11, más preferentemente de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 10, y aún más preferentemente de aproximadamente pH 7,6 a aproximadamente pH 9,6. En una realización no limitante de la invención usando TNFR:Fc que se ilustra más adelante, se descubrió que el pH óptimo era de aproximadamente pH 8,6. Sin embargo, el pH óptimo para una realización particular de la invención puede determinarse fácilmente experimentalmente por los expertos en la materia.

[0034] El reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación es una fuente de agentes reductores. Los agentes reductores preferidos son tioles libres. El reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación preferentemente está compuesto por un compuesto del grupo que consiste en glutatión reducido y oxidado, ditioneitol, (DTT), 2-mercaptoetanol, ditionitrobenzoato, cisteína y cistina. Para facilitar el uso y la economía, puede usarse glutatión reducido y/o cisteína reducida.

[0035] El reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación está presente en una concentración suficiente para aumentar la proporción relativa de la conformación deseada. La concentración óptima del reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación depende de la concentración de proteína y del número de enlaces disulfuro en la proteína. Por ejemplo, usando una proteína (TNFR:Fc) con 29 enlaces disulfuro a una concentración de 2 mg/ml (proteína aproximadamente 14 microM o disulfuro 400 microM), se ha descubierto que un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación con tioles reducidos 2 mM funcionaba bien para aumentar la proporción relativa de la conformación deseada. Esto corresponde a una relación de aproximadamente 35 tioles libres por un enlace disulfuro. Sin embargo, también se observó que funcionaban relaciones de 20 a 400 tioles libres por disulfuro. Por supuesto, la cantidad de tiol usado para una concentración particular puede variar en alguna medida dependiendo de la capacidad reductora del tiol, y puede determinarse fácilmente por un experto en la materia.

[0036] De esta manera, generalmente, la concentración de tioles libres del reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación puede ser de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 50 mM, mas preferentemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM y aún más preferentemente de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 20 mM.

[0037] Además, el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación puede contener tioles oxidados a concentraciones aproximadamente mayores, iguales o menores que el componente de tiol reducido. Por ejemplo, el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación puede ser una combinación de glutatión reducido y glutatión oxidado. Se ha descubierto mediante ejemplos de trabajo reales, que una relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 100:1 (tioles reducidos:tioles oxidados) puede funcionar igualmente bien. Como alternativa, en otra realización, el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación puede ser cisteína o una combinación de cisteína y cistina. De esta manera, cuando se incluyen tioles oxidados en el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación inicial, la relación entre tioles reducidos y tioles oxidados puede ser, en una realización preferida, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1000:1, más preferentemente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 500:1, aún más preferentemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1, e incluso más preferentemente aproximadamente 10:1.

[0038] La puesta en contacto de la preparación de proteína recombinante con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar la proporción relativa de la conformación deseada. Es deseable cualquier aumento relativo en la proporción, pero preferentemente al menos un 10% de la proteína con una conformación indeseada se convierte en una proteína con la conformación deseada. Más preferentemente, al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e incluso un 80% de la proteína se convierte desde una conformación indeseada en una conformación deseada. Los rendimientos típicos que se han conseguido con los métodos de la invención varían del 40 al 80%. Si la etapa de contacto se realiza sobre una preparación de proteína recombinante parcialmente o muy purificada, la etapa de contacto puede realizarse durante un periodo tan corto como de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, y durante un periodo tan largo como de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 4 días. Se ha descubierto que una etapa de contacto de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 horas o de aproximadamente 18 horas funciona bien. La etapa de contacto también puede realizarse durante otra etapa, tal como en una fase sólida o durante la filtración o cualquier otra etapa de purificación.

[0039] Los métodos de la invención pueden realizarse en un amplio intervalo de temperaturas. Por ejemplo, los métodos de la invención se han realizado satisfactoriamente a temperaturas de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 37 °C, sin embargo, se consiguieron los mejores resultados a temperaturas inferiores. Una temperatura típica para la puesta en contacto de una preparación parcial o completamente purificada de la proteína recombinante es de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C (ambiente), pero también puede realizarse a temperaturas inferiores y a temperaturas superiores.

[0040] La preparación de proteína recombinante puede ponerse en contacto con el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación en diversos volúmenes, según sea apropiado. Por ejemplo, los métodos de la invención se han realizado satisfactoriamente a escala de laboratorio analítico (1-50 ml), a escala preparativa (50 ml-10 l) y a escala

de fabricación (10 l o más). De esta manera, los métodos de la invención pueden realizarse tanto a pequeña escala como a gran escala con reproducibilidad.

[0041] En aspectos preferidos, la etapa de contacto se realiza en ausencia de cantidades significativas de agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, SDS, urea y guanidinio HCl. Se necesitan cantidades significativas de agentes caotrópicos para observar un desplegamiento perceptible. Generalmente, está presente una concentración menor de 1 M de caótropro, más preferentemente menor de 0,5 M, y aún más preferentemente menor de 0,1 M de caótropro. Una solución carece esencialmente de caótropro (por ejemplo, SDS, urea y guanidinio HCl) cuando no se ha añadido a propósito caótropro a la solución, y sólo pueden estar presentes niveles muy pequeños (por ejemplo, menores de 10 mM) (por ejemplo, procedentes del recipiente o como un subproducto celular).

[0042] El intercambio de disulfuro puede detenerse de cualquier forma conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación puede retirarse o su concentración reducirse mediante una etapa de purificación, y/o puede inactivarse químicamente, por ejemplo, acidificando la solución. Típicamente, cuando la reacción se detiene por acidificación, el pH de la solución que contiene el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación se reduce por debajo de pH 7. Preferentemente, el pH se reduce a un valor inferior a pH 6. En general, el pH se reduce a un valor comprendido entre aproximadamente pH 2 y aproximadamente pH 7.

[0043] La determinación de la conformación de una proteína, y de las proporciones relativas de una conformación de una proteína en una mezcla, puede realizarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas analíticas y/o cualitativas. Si hay una diferencia en actividad entre las conformaciones de la proteína, la determinación de la proporción relativa de una conformación en la mezcla puede realizarse por medio de un ensayo de actividad (por ejemplo, unión a un ligando, actividad enzimática, actividad biológica, etc.). Por ejemplo, en una de las realizaciones no limitantes descritas más adelante, pueden resolverse al menos dos conformaciones diferentes de TNFR:Fc usando un ensayo de unión a TNF en fase sólida. El ensayo, esencialmente como se describe para IL-1R (Slack, et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 2513-2524), puede diferenciar entre las proporciones relativas de diversas conformaciones de proteínas por cambios en las constantes de asociación, disociación o inhibición de la unión ligando-receptor generadas. Como alternativa, los resultados de unión pueden expresarse como unidades de actividad/mg de proteína.

[0044] Si dos conformaciones se resuelven de forma diferente durante la cromatografía, electroforesis, filtración u otra técnica de purificación, la proporción relativa de una conformación en la mezcla puede determinarse usando dichas técnicas de purificación. Por ejemplo, en las realizaciones no limitantes descritas más adelante, podrían resolverse al menos dos conformaciones diferentes de TNFR:Fc por medio de cromatografía de interacción hidrófoba. Además, como se ha usado dicroísmo circular lejano para estimar la composición de estructura secundaria de proteínas (Perczel et al., 1991, Protein Engrg. 4:669-679), dicha técnica puede determinar si están presentes conformaciones alternativas de una proteína. Otra técnica usada para determinar la conformación es la espectroscopia de fluorescencia que puede emplearse para determinar diferencias complementarias en la estructura terciaria asignables a fluorescencia de triptófano y tirosina. Otras técnicas que pueden usarse para determinar diferencias en conformación y, por lo tanto, las proporciones relativas de una conformación son SEC en línea para medir el estado de agregación, calorimetría diferencial de barrido para medir transiciones de fusión (T_m) y entalpías de componentes, y desplegamiento por caótropos.

[0045] Por el término "aislamiento" se entiende la separación física de al menos un componente en una mezcla de otros componentes de la mezcla. El aislamiento de componentes de conformaciones particulares de una proteína puede conseguirse usando cualquier método de purificación que tienda a separar dichos componentes. Por consiguiente, se pueden realizar una o más etapas de cromatografía incluyendo, pero sin limitación, HIC, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de intercambio iónico, afinidad y SEC. Otros métodos de purificación son filtración (por ejemplo, filtración de flujo tangencial), técnicas electroforéticas (es decir, electroforesis, electroelución, enfoque isoeléctrico) y separación de fases (por ejemplo, separación de fases en PEG-dextrano), por nombrar algunos. Además, la fracción de la preparación de proteína recombinante que contiene la proteína en la conformación indeseada puede tratarse de nuevo en los métodos de la invención, para optimizar adicionalmente los rendimientos de proteína con la conformación deseada.

[0046] Por ejemplo, después del tratamiento, pueden prepararse muestras de proteína para cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) por el siguiente método. Se añade un volumen igual de citrato sódico 850 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 6,5 a la muestra tratada, y se deja equilibrar a temperatura ambiente. Después de la filtración (por ejemplo, usando un filtro de 0,22 μm), se realiza cromatografía HIC en una resina Toyopearl® Butyl 650-M (Tosoh Biosep LLC, Montgomeryville, PA), a un caudal de 150 cm/h, y una carga de masa de 2,1 mg·ml de resina⁻¹. La columna se preequilibra con 3 volúmenes de columna de citrato sódico 425 mM, PO₄ 50 mM pH 6,5, se carga la muestra y después se lava con 3 volúmenes de columna de citrato de Na 425 mM, PO₄ 50 mM pH 6,5. La elución puede realizarse con un gradiente de citrato de Na 425 mM, PO₄ 50 mM pH 6,5 a citrato de Na 0 mM, PO₄ 50 mM pH 6,5 en un total de 5 volúmenes de columna. Pueden recogerse fracciones durante la elución. La columna puede limpiarse con 3 volúmenes de columna de agua seguido de 3 volúmenes de columna de NaOH 0,1 M. Usando los métodos de la invención, por consiguiente, se pueden obtener preparaciones de TNFR:Fc que contengan más de un

85%, más de un 90% e incluso más de un 95% del TNFR:Fc presente en la preparación en la conformación más activa (fracción N° 2). Por lo tanto, también se proporcionan en la invención composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, de TNFR:Fc que contienen dichas proporciones de fracción N° 2.

[0047] La invención también incluye opcionalmente la formulación adicional de las proteínas. Por el término "formulación" se entiende que las proteínas pueden someterse a intercambio de tampón, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final. Para los fines de la invención, la expresión "forma a granel estéril" significa que una formulación está exenta, o esencialmente exenta de contaminación microbiana (en tal medida que es aceptable para fines alimentarios y farmacéuticos), y es de una composición y concentración definidas. La expresión "forma de dosificación unitaria estéril" significa una forma que es apropiada para la administración o consumo por el el cliente y/o paciente. Dichas composiciones pueden comprender una cantidad eficaz de la proteína, en combinación con otros componentes tales como un diluyente, vehículo y/o excipiente fisiológicamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Además, las formas a granel estériles y las formas unitarias estériles pueden contener una pequeña concentración (de aproximadamente 1 micro M a aproximadamente 10 mM) de un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación (por ejemplo, glutatión, cisteína, etc.). Los polipéptidos pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos usados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Pueden combinarse en mezcla, como el único material activo o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, solución salina, Tris-HCl, acetato y soluciones tamponadas con fosfato), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico y parabenos), emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o vehículos. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. Además, dichas composiciones pueden complejarse con polietilenglicol (PEG), iones metálicos y/o incorporarse en compuestos poliméricos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano, etc. o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposomales está dentro del nivel de experiencia en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.235.871; Patente de Estados Unidos N° 4.501.728; Patente de Estados Unidos N° 4.837.028 y Patente de Estados Unidos N° 4.737.323. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo*, y por lo tanto se eligen de acuerdo con la aplicación deseada, de forma que las características del vehículo dependerán de la vía de administración seleccionada. Las formas de liberación sostenida adecuadas para uso incluyen, pero sin limitación, polipéptidos que se encapsulan en un polímero biocompatible de disolución lenta (tal como las micropartículas de alginato descritas en el documento de Estados Unidos N° 6.036.978), se mezclan con dicho polímero (incluyendo hidrogeles aplicados tópicamente), y/o se encierran en un implante semipermeable biocompatible.

[0048] Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO 1

Evaluación Biofísica de Fracciones N° 2 y N° 3 de TNFR:Fc

[0049] TNFR:Fc eluye de una columna de interacción hidrófoba (HIC) como tres picos distintos denominados fracción N° 1, fracción N° 2 y fracción N° 3 (véase la Figura 1). La fracción N° 2 es la fracción deseada. La fracción N° 3 era de interés particular, ya que puede constituir de un 20 a un 60% de la muestra y se ha demostrado que presenta una baja actividad de unión a TNF y bioactividad A375 en comparación con la fracción N° 2. Por lo tanto, para comprender las diferencias entre estas dos fracciones y determinar los factores que contribuyen a la pérdida de actividad para la fracción N° 3 relacionados con la estructura y conformación, se realizaron estudios biofísicos. En este ejemplo, se analizó la fracción N° 2 y la fracción N° 3 usando dicroísmo circular, fluorescencia, SEC en línea/UV/LS/RI y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Materiales y Métodos:

[0050] **Materiales:** El material de partida fue TNFR:Fc en tampón TMS (Tris 10 mM, 4% de manitol, 1% de sacarosa). Las fracciones eluidas de la HIC de este material se aislaron como fracciones N° 2 y N° 3 para los estudios experimentales descritos a continuación.

[0051] **Dicroísmo circular:** Se realizaron estudios en las regiones UV cercana (250-340 nm) y lejana (190-250 nm). Los estudios de la región UV cercana se realizaron para esclarecer las diferencias en la estructura terciaria, mientras que los estudios en la región UV lejana se usaron para caracterizar diferencias en la estructura secundaria.

[0052] Las mediciones de dicroísmo circular UV cercano se realizaron en las soluciones de TMS con las siguientes concentraciones. El material de partida se diluyó a 6,25 mg/ml mientras que las fracciones N° 2 y N° 3 se evaluaron a sus concentraciones existentes de 9,4 y 5,4 mg/ml respectivamente. Se usó una celda de dicroísmo circular con una longitud de trayectoria de 0,1 cm y las exploraciones se realizaron desde 340 a 250 nm.

[0053] Las mediciones de dicroísmo circular UV lejano se realizaron con el tampón de proteína cambiado a fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) y posteriormente se evaluaron usando una celda de longitud de trayectoria de 0,1 cm explorada desde 250 a 190 nm. La composición de la estructura secundaria se evaluó usando el análisis de restricción convexo (Convex Constraint Analysis) (CCA) (Perczel et al., 1991, Protein Engrg. 4:669-679).

[0054] **Espectroscopía de Fluorescencia:** Se examinaron las muestras después de la dilución hasta aproximadamente 50 microgramos/ml usando dos longitudes de onda de excitación diferentes. Se examinó la fluorescencia de tirosina y triptófano con una excitación de 270 nm mientras que la fluorescencia de triptófano se evaluó exclusivamente usando una excitación de 295 nm (Lakowicz, J.R. en "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, 1983. Nueva York, N.Y., 342-343). Las exploraciones de fluorescencia se extendieron desde 300 a 440 nm para una excitación de 270 nm y desde 310 a 440 nm para una excitación de 295 nm. Para cada espectro se obtuvo una señal media de cuatro exploraciones consecutivas. Se presentaron datos normalizados para evaluar diferencias en frecuencia procedentes de las muestras.

[0055] **SEC/UV/LS/RI en línea:** Se determinaron los pesos moleculares de los componentes de elución usando cromatografía de exclusión molecular, usando detección ultravioleta (UV a 280 nm), dispersión de luz (90°) e índice de refracción (RI) en serie. Este método está bien documentado (véase Arakawa et al., 1992, Anal. Biochem. 203:53-57 y Wen et al., 1996, Anal. Biochem. 240:155-166) y tiene la ventaja de medir los pesos moleculares de proteínas no glicosiladas y péptidos que están glicosilados. Los datos de SEC y UV se recogieron usando un sistema de HPLC integral (PerSeptive Biosystems, Inc.) con una columna BioSil-400-5 (de BioRad) usando un caudal de 1 ml/min. El tampón de elución consistía en fosfato 100 mM (pH 6,8) y NaCl 100 mM. Se adquirieron un detector de dispersión de luz multiángulo DAWN DSP y un refractómetro Optilab DSP en Wyatt Technology, Inc. Los patrones de calibración para determinar las constantes instrumentales incluían dímero de BSA, monómero de BSA y ovoalbúmina (Figura 2).

[0056] **Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):** Las propiedades físicas del desplegamiento se midieron usando un instrumento de DSC MicroCal MC-2 en modo upscan. Las muestras se prepararon por intercambio de tampón en el mismo tampón TMS a pH 7,4. Las muestras contenían aproximadamente 4 mg/ml de proteína y se evaluaron contra el tampón (sin proteína) como referencia. La velocidad de exploración fue de 67°C/h que abarcaba el régimen de temperaturas de 20°C a 90°C. Las exploraciones recogidas posteriormente se convirtieron en exploraciones de concentración normalizada para comparar mejor el comportamiento entálpico de transiciones de desplegamiento mientras se tenían en cuenta las diferencias en concentración (datos presentados como kcal/mol).

40 Resultados:

[0057] **Dicroísmo Circular.** En la Figura 2 se muestran las mediciones de dicroísmo circular UV cercano expresadas en términos de elipticidad media de los residuos. Fueron evidentes cambios en un rasgo amplio próximo a 270 nm entre la fracción N° 2 y N° 3 como se muestra por una mayor proporción de elipticidad negativa en el espectro de la fracción N° 3 (indicado por la flecha en la Figura 2A). Se detectó que el comportamiento espectral del material de partida se parece mucho al de la fracción N° 2, pero presenta un ligero desplazamiento negativo en la misma región alrededor de 270 nm. Este resultado parecía coherente con que la fracción N° 3 constituyera una pequeña parte del material de partida y, por lo tanto, su contribución a la elipticidad global en esta región se había reducido en gran medida pero en la misma dirección de desplazamiento. La reproducibilidad del espectro de la fracción N° 3 confirmó que el desplazamiento observado de esta muestra era real. Considerando esto, y sabiendo que los disulfuros dan lugar a un rasgo elíptico negativo ancho en esta región del espectro de dicroísmo circular (véase Kahn, P.C., 1978, Methods Enzymol. 61:339-378 y Kosen et al., 1981, Biochemistry 20:5744-5754), el espectro de dicroísmo circular UV cercano se ajustó a una curva para estimar lo que significan los cambios observados en esta región en términos de la estructura terciaria. Los resultados de los datos de ajuste a la curva se presentan en la Figura 2B y mostraron un pequeño desplazamiento al rojo (3 nm) y un mayor desplazamiento negativo coherente con la contribución procedente de un cambio en la estructura terciaria que implica disulfuros cuando se compara la fracción N° 3 con la fracción N° 2.

[0058] El dicroísmo circular UV lejano se ha usado para estimar la composición de estructura secundaria de proteínas (Perczel et al., 1991, Protein Engrg. 4:669-679). Se realizaron asignaciones de estructuras secundarias usando CCA. Los espectros calculados que comprendían la suma de los elementos de estructura secundaria se compararon con espectros observados experimentalmente y presentaron un buen ajuste. Las estructuras secundarias de las dos fracciones fueron comparables dentro de límites de precisión experimental (dentro del 10%). Por lo tanto, este experimento no distinguía ninguna diferencia en relación con la estructura secundaria para ninguna de estas dos fracciones.

[0059] Espectroscopia de Fluorescencia. Sabiendo que había diferencias significativas observadas en la región de dicroísmo circular UV cercano, se empleó espectroscopia de fluorescencia para determinar diferencias complementarias en la estructura terciaria asignables a la fluorescencia del triptófano y tirosina. Usando dos longitudes de onda de excitación, fue posible determinar que los espectros para los tres casos considerados (SM, fracción N° 2 y N° 3) eran superponibles con máximos de fluorescencia próximos a 338 nm. Como la estructura tridimensional de una proteína dada es responsable de los máximos de emisión de proteínas nativas, estos resultados sugirieron que la estructura media que implicaba a los fluoróforos intrínsecos, triptófano y tirosina, no se había alterado.

10

[0060] SEC/UV/LS/RI en línea. Los estudios de dispersión de luz realizados en línea con SEC produjeron pesos moleculares del pico de elución principal que estaban de acuerdo con el peso molecular del polipéptido no glicosilado de TNFR:Fc (por ejemplo, 102 kD). Aunque hubo claras diferencias en las composiciones de las especies de elución evaluadas con esta técnica, comparando el perfil de elución de la fracción N° 3 con la fracción N° 2 (Figura 3A y B), se midió el pico principal que comprendía el componente mayoritario y éste era de $102,5 \pm 1,6$ kD (volumen de retención = 8,4 ml) y $101,9 \pm 2,1$ kD (volumen de retención = 8,3 ml), respectivamente. La precisión se expresó como la desviación típica de 23 cortes a través del pico de elución encerrado por las líneas de trazos verticales en la Figura 3. También se detectó que una señal apreciable del saliente descendiente para la fracción N° 3 permitió la determinación del peso molecular del polipéptido que era de $78,1 \pm 3,7$ kD (esta evaluación consideró 8 cortes alrededor del pico marcado en 8,85 ml). Como se muestra por la precisión asociada con la determinación del peso molecular de este componente, este pico presentó una mayor heterogeneidad y, como resultado, se sospechó de la existencia de una mayor polidispersión que en el pico principal. La fracción N° 3 también contenía una cantidad significativa de especies de alto peso molecular coherente con el volumen de elución de una forma predominantemente dimerica de TNFR:Fc (próxima a 7,5). Por lo tanto, se determinó que la fracción N° 3 comprende varias especies que incluyen agregados y partes fragmentadas de la molécula.

[0061] Calorimetría Diferencial de Barrido. Las mediciones de DSC realizadas en las dos fracciones produjeron diferencias significativas en el desplegamiento de la porción TNFR de la molécula de TNFR:Fc (Figura 4). Como se muestra más claramente en los datos corregidos con respecto a los valores basales (Figura 4B), hay un desplazamiento de 2,8°C hacia una menor temperatura en la transición de fusión (T_m) cuando se compara una T_m de 52,5°C (fracción N° 2) con una T_m de 49,7°C (fracción N° 3). La transición es ligeramente más amplia para la fracción N° 3 con una amplitud media a la mitad del máximo de transición de 8°C en comparación con la fracción N° 2 que tenía una amplitud media de 6,5°C. Se ha identificado a partir de los experimentos de desplegamiento térmico del monómero de TNFR:Fc que esta baja temperatura de transición se debe al dominio de TNFR de la molécula. Las transiciones térmicas a 69,1°C y 83,4°C se han asignado a la parte Fc de la molécula. Estas dos últimas transiciones de desplegamiento se alinean bien y son comparables en términos de T_m y entalpías de componentes.

Discusión:

[0062] Entre los métodos ensayados, se observaron diferencias en el dicroísmo circular UV cercano y en las mediciones de DSC. Los datos de la calorimetría diferencial de barrido confirman una imprecisión de la estructura que es asignable a la porción receptora de la molécula con pocos cambios observados en la región de la Fc. Los resultados del dicroísmo circular UV cercano sugirieron que los disulfuros están implicados en los cambios de estructura terciaria asociados con la fracción N° 3. Estos cambios pueden producirse como una consecuencia de disulfuros ocultos que consiguen más exposición al disolvente y responden de un aumento en la hidrofobia como se sugiere por el pequeño aumento en el tiempo de retención observado en elución por HIC de la fracción N° 3. Es interesante que no se hayan encontrado diferencias discernibles en los datos de fluorescencia que indiquen dicho cambio en la estructura conformacional. Si se considera la estructura primaria de TNFR:Fc en términos de la distribución de tirosinas (Y) y triptófanos (W), es evidente que la región que se extiende desde la parte C terminal del residuo 104 del dominio de TNFR al residuo 296 de la parte N terminal de la Fc (que comprende el 40% de la secuencia lineal de TNFR:Fc) carece de estos fluoróforos intrínsecos. Por lo tanto, una posible explicación coherente con los datos podría ser que la estructura terciaria lejana de la región de bisagra de Fc permanece relativamente invariable mientras que la que está alrededor del residuo C115 a C281 puede alterarse en alguna medida conformacionalmente. Esta región de la molécula comprende 10 posibles cisteínas que pueden verse afectadas con una pequeña consecuencia supuesta de cambio estructural que afecta a la estructura local de las tirosinas y triptófanos. Debe indicarse que actualmente se desconoce cómo se pliega esta molécula y parecería plausible que las cisteínas que constituyen los disulfuros que están más alejadas de cualquier residuo dado de triptófano o tirosina serían los sospechosos lógicos para los cambios de la estructura terciaria que producen los resultados de dicroísmo circular UV cercano observados pero presentan poco impacto sobre la estructura vecina que implica tirosinas y triptófanos. Esta idea no excluye la posibilidad de que haya algún cambio poco habitual en la estructura dentro de uno o los dos brazos de TNFR que no induce un cambio apreciable en el efecto neto de fluorescencia debido a las tirosinas y triptófanos. El hecho de que los datos de fluorescencia (que es insensible a disulfuros) no muestren ningún cambio y el UV cercano (que es sensible a disulfuros, tirosinas y triptófanos) presente un pequeño desplazamiento negativo coherente con la modificación estructural de disulfuro implica que los disulfuros intervienen en la diferencia entre las fracciones N° 2 y N° 3.

[0063] Al resumir los datos restantes generados en relación con la fracción N° 3 se descubrió que los aspectos relacionados con el peso molecular y la estructura secundaria eran indistinguibles de la fracción N° 2.

5 EJEMPLO 2

Experimentos de Intercambio de Disulfuro en la Fracción N° 3 de TNFR:Fc con Glutión

[0064] Este experimento se diseñó para evaluar una diversidad de tratamientos para llevar a la fracción N° 3 de TNRF:Fc a la conformación de la fracción N° 2 en un proceso susceptible de ensayos de producción a gran escala.

Materiales y Métodos:

[0065] **Materiales.** El material de partida era TNFR:Fc como un eluido de proteína A, un eluido de HIC puro de fracción N° 3 y una mezcla 50:50 de eluidos de HIC de fracción N° 2 y fracción N° 3. Los tampones eran citrato 0,1 M o Tris/glicina 0,1 M a pH 7,6, pH 8,6 o pH 9,6. La concentración de proteína del TNFR:Fc era de 0,2 a 4,5 mg/ml. Se añadió un sistema de acoplamiento redox de glutión reducido y glutión (GSH/GSSG a una relación de 10:1) a GSH de 0,1 a 5 mM. La temperatura de incubación se varió a 4 grados, 22 grados o 31 grados centígrados.

[0066] **Métodos.** El intercambio de disulfuro se inactivó por acidificación de la muestra a pH 6 con ácido acético 1 M. Las preparaciones tratadas de proteína recombinante se caracterizaron por HIC analítica, SEC (tiempo de retención, concentración de agregados) y ensayo de unión a TNF en fase sólida para determinar el porcentaje y el rendimiento de fracción N° 2.

25 Resultados y Discusión:

[0067] Eficacia del tratamiento en función del pH y la concentración de GSH. Un % significativo de la proteína de la fracción N° 3 (al menos un 10%) se convirtió en fracción N° 2 cuando el tratamiento se realizó en GSH 0,1 mM/pH 7,6 y GSH 0,1 mM/pH 8,6. Sin embargo, la eficiencia mejoró en gran medida (de un 45% a casi un 70%) cuando el tratamiento se realizó en GSH 0,1 mM/pH 9,6; GSH 1 mM/pH 7,6; GSH 1 mM/pH 8,6; y GSH 1 mM/pH 9,6. De esta manera, aunque la eficiencia del tratamiento es sensible al pH y a la concentración de tiol libre, puede realizarse eficazmente en un amplio intervalo de estas variables.

[0068] Efectos de la temperatura. La fracción N° 3 se trató a tres temperaturas diferentes, 4°C, 22°C y 31°C. La concentración de GSH se mantuvo a 1 mM y pH 8,6. Después de 16 horas, todos los grupos de tratamiento presentaron una conversión significativa de la fracción N° 3 en fracción N° 2, pero la conversión parecía ligeramente más eficaz a las dos temperaturas inferiores.

[0069] Efectos del clon. Se ensayaron seis clones de líneas celulares diferentes, todos productores de TNFR:Fc, en un protocolo estandarizado basándose en los resultados anteriores. Específicamente, la elución de Proteína A que contenía de 0,4 a 0,7 mg/ml de TNFR:Fc (a aproximadamente pH 4) se ajustó a pH 8,6 usando Tris/glicina 1 M (concentración final de Tris/glicina 0,1 M). Estas soluciones se ajustaron a EDTA 1 mM y GSH 2,5 mM/GSSG 0,25 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. El intercambio de disulfuro se inactivó por acidificación como se ha descrito anteriormente.

[0070] Cada uno de seis clones diferentes mostró una mejora en la producción y el rendimiento de la fracción N° 2. La reducción de la fracción N° 3 de HIC por tratamiento en los diversos clones fue del 64%, 72%, 77%, 78%, 78% y 83%. El aumento en la fracción N° 2 de HIC en los mismos clones fue del 37%, 64%, 78%, 70%, 44% y 54% respectivamente. El porcentaje de aumento en la fracción N° 2 de HIC se correlacionaba bien con el % de aumento en las Unidades de unión, como se muestra en la Figura 5. De esta manera, los métodos parecían generalmente aplicables en todos los clones ensayados.

[0071] Ensayos de unión. Se ensayaron tres preparaciones diferentes de TNFR:Fc en un ensayo de unión a TNF en fase sólida. Las muestras 11-6 y 12 fueron eluyentes de una columna de Proteína A. La muestra 8085-47 también se eluyó de una columna de Proteína A y después se sometió a una etapa de purificación de HIC adicional; esta muestra contenía exclusivamente la fracción N° 3. Las muestras se examinaron en el ensayo de unión anterior y después se sometieron a intercambio disulfuro como se ha descrito anteriormente. Los resultados presentados a continuación en la Tabla 1 muestran un aumento en la actividad de unión al ligando después del tratamiento de todas las muestras con glutión.

Tabla 1

Actividad de unión a TNF de TNFR:Fc antes y después del intercambio de disulfuro			
Muestra	Antes del intercambio	Después del intercambio	% de cambio
	(Actividad/mg de proteína)		
11-6	$4,16 \times 10^7$	$5,73 \times 10^7$	27%
12	$4,36 \times 10^7$	$6,13 \times 10^7$	29%
8085-47	$1,90 \times 10^7$	$6,75 \times 10^7$	72%

5

EJEMPLO 3**Experimento de Intercambio de Disulfuro en TNFR:Fc tratado con L-cisteína**

10 **[0072]** Este experimento se diseñó para evaluar la cisteína/cistina como reactivos de acoplamiento de reducción/oxidación para TNFR:Fc. El procedimiento permite la evaluación del cambio de la fracción N° 3 de HIC en la conformación de la fracción N° 2 en un proceso susceptible de ensayos de producción a gran escala. El procedimiento puede realizarse sobre una fracción N° 3 purificada, una mezcla de fracciones N° 2 y N° 3 y/o después de otras técnicas de separación tales como cromatografía en proteína A, con resultados similares.

15

Materiales y Métodos:

[0073] El material de partida era TNFR:Fc como un eluido de HIC puro de la fracción N° 3 o como un TNFR:Fc eluido de Proteína A que contenía tanto la fracción N° 2 como la fracción N° 3. Los tampones eran citrato 0,1 M o Tris 0,2 M a pH 8,5. La concentración de proteína de TNFR:Fc fue de 2,5 a 3 mg/ml.

20

[0074] Se utilizó un sistema de acoplamiento redox de L-cisteína (que variaba de 0 a 50 mM). El procedimiento también se evaluó con +/- L-cisteína (de 0,025 a 0,5 mM) y +/- EDTA 1 mM. La temperatura de incubación se evaluó a 4, 15 y 22 grados centígrados durante 6, 18 y 48 horas. El intercambio de disulfuro se inactivó por acidificación de la muestra a pH 7 con NaH_2PO_4 o citrato 0,85 M. Las preparaciones tratadas de proteína recombinante se caracterizaron por HIC analítica y SEC (tiempo de retención, concentración de agregado) para determinar el porcentaje y rendimiento de fracción N° 2 y fracción N° 3, cisteinilación y ensayos de sulfhidrilo libre.

25

Resultados y Discusión:

30

[0075] Eficacia del tratamiento en función de la concentración de L-cisteína (0-5 mM). Un porcentaje significativo de la proteína TNFR:Fc en la fracción N° 3 de HIC (promedio del 10%) se convirtió en fracción N° 2 cuando el tratamiento se realizó con L-cisteína 0,25 mM en ausencia de L-cistina o EDTA en cuatro muestras replicadas (Figura 6). Sin embargo, la eficacia se mejoró en gran medida (del 45% a casi el 70%) cuando el tratamiento se realizó en L-cisteína 1 mM o L-cisteína 5 mM (Figura 6). El efecto de la cistina en estas condiciones de reacción varió con la presencia de EDTA (véase mas adelante). Para un lote de cultivo celular dado (se trataron muestras de cuatro lotes de cultivo celular diferentes), el proceso de tratamiento fue reproducible.

35

[0076] Eficacia del tratamiento en función de una mayor concentración de L-cisteína (5-50 mM). Las mayores concentraciones de L-cisteína (L-cisteína 5, 15 y 50 mM) usadas para tratar TNFR:Fc dieron como resultado una reducción en la fracción N° 3 de HIC procedente del material de partida en cada caso, pero la L-cisteína 5 mM fue la más eficaz para promover la acumulación de fracción N° 2 (Figura 7). Se estima que mayores concentraciones de L-cisteína reducían significativamente los restos sulfhidrilo en la molécula o requerían demasiado tiempo para reoxidarse.

40

[0077] Eficacia del tratamiento en función del suministro adicional de L-cisteína. Para intentar aumentar la eficacia del intercambio de disulfuro, se trató TNFR:Fc con L-cisteína 5 mM y se incubó a 4 grados centígrados durante 18 horas. Después se añadió más L-cisteína (0-5 mM) y las muestras se incubaron a 4 grados centígrados durante dos días más. En estas condiciones, no se detectó ningún efecto significativo sobre la relación de fracción N° 3 de HIC con respecto a la fracción N° 2 por el suministro adicional de L-cisteína.

45

[0078] Efecto de EDTA, cistina y L-cisteína. El efecto de cistina (0-0,4 mM) en combinación con L-cisteína (5 mM) sobre TNFR:Fc se evaluó en presencia o ausencia de EDTA 1 mM. Se obtuvieron resultados óptimos en presencia de EDTA 1 mM con concentraciones de cistina en el intervalo de 0,1 a 0,2 mM.

50

[0079] Efectos de cobre, temperatura y tiempo. Se trató TNFR:Fc con L-cisteína 5 mM a 4 grados y 22 grados centígrados durante 6 ó 18 horas. La finalización del tratamiento de TNFR:Fc se ensayó por adición de cobre seguida de HIC. Después de 6 horas de incubación, el intercambio de disulfuro es más completo a 4 grados que a 22 grados, y el tratamiento es claramente más completo después de 18 horas a 4 grados centígrados (Figura 8A y 8B).

55

60

[0080] Comparación de eficacia del tratamiento con L-cisteína a escala analítica frente a preparativa. Basándose en las condiciones de tratamiento optimizadas a pequeña escala, se trató TNFR:Fc (2,5 mg/ml en Tris 0,2 M, pH 8,5) en cantidades de 3 ml o 20 l con L-cisteína 5 mM (en ausencia de cistina o EDTA), se incubó a 4 grados centígrados durante 18 horas, se diluyó con un volumen igual de citrato sódico 850 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 6,5 para inactivar el tratamiento, y se cromatografió en HIC. Las muestras de control de TNFR:Fc a escala preparativa y analítica tenían un 63% y 68% de fracción N° 3 respectivamente. Después del tratamiento con las condiciones anteriores, la fracción N° 3 se redujo a un 28% tanto en la escala preparativa como en la escala analítica. Por lo tanto, la eficacia del tratamiento fue del 56% y 59% para las muestras preparativa y analítica, respectivamente (Tabla 2). Este experimento demuestra que el proceso es susceptible de un tratamiento a mayor escala.

Tabla 2
Procedimiento de Intercambio de Disulfuro de Escala Analítica frente a Preparativa

	PREPARATIVA		ANALÍTICA	
	Fracción N° 2	Fracción N° 3	Fracción N° 2	Fracción N° 3
Control	37%	60%	32%	68%
Intercambio	72%	28%	72%	28%
“Eficacia” de intercambio		56%		59%

15 **[0081]** De esta manera, aunque la eficacia del tratamiento redox se ve afectada por la concentración de tiol libre, la temperatura y el tiempo, puede optimizarse eficazmente y realizarse en un amplio intervalo de variables. Los protocolos de tratamiento también pueden realizarse tanto a pequeña escala como a gran escala con reproducibilidad.

20 **[0082]** Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria pretenden ser sólo ilustraciones de aspectos individuales de la invención. De hecho, para los expertos en la materia serán evidentes, tras la descripción anterior y los dibujos adjuntos, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

1. Un método para promover una conformación deseada de una forma soluble recombinante glicosilada de un receptor de TNF que ha sido secretado por una célula de mamífero, comprendiendo el método poner en contacto
5 una preparación de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF que contiene una mezcla de al menos dos isómeros configuracionales de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF con un reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación, que es una fuente de un agente reductor, durante un tiempo suficiente para aumentar la proporción relativa del isómero configuracional deseado y determinar la proporción relativa del isómero configuracional deseado en la mezcla, donde el isómero configuracional deseado tiene una
10 mayor afinidad de unión que un isómero configuracional indeseado por un ligando afín del receptor de TNF.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor de TNF es un receptor de TNF p75.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF contiene
15 al menos dos dominios.
4. El método de la reivindicación 3, en el que al menos un dominio de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF tiene una conformación estable, y al menos un dominio de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF tiene una conformación inestable, uno con respecto al otro.
20
5. El método de la reivindicación 1, en el que la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF es una proteína de fusión Fc.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la preparación de la forma soluble recombinante glicosilada del
25 receptor de TNF se ha purificado en una columna de Proteína A o Proteína G.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el contacto se realiza a un pH de 7 a 10.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el pH es 8,6.
30
9. El método de la reivindicación 1, en el que el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación se selecciona del grupo que consiste en glutatión, cisteína, DTT (ditiotreitól), 2-mercaptoetanol y ditionitrobenzoato.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación comprende
35 glutatión reducido.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el glutatión reducido está a una concentración de 1 mM a 10 mM.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación comprende
40 cisteína reducida.
13. El método de la reivindicación 9, en el que la relación entre tioles reductores en el reactivo de acoplamiento de reducción/oxidación y enlaces disulfuro en la proteína es de 320 tioles reductores:1 enlace disulfuro a 64.000 tioles reductores:1 enlace disulfuro.
45
14. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de proteína es de 0,5 a 10 mg/ml.
15. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto se realiza durante 4 a 16 horas.
- 50 16. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto se realiza a 25°C.
17. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto se realiza a 4°C.
18. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto se detiene por acidificación.
55
19. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende una o más etapas cromatográficas.
20. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende una reacción de unión.
60
21. El método de la reivindicación 1, que comprende aislar una fracción de la preparación de la forma soluble recombinante glicosilada del receptor de TNF con el isómero configuracional deseado.
22. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 21, que comprende formular el isómero configuracional
65 deseado en una forma de dosificación unitaria estéril.

23. El método de la reivindicación 1, en el que el isómero configuracional deseado tiene una mayor afinidad de unión por un TNF.

24. El método de la reivindicación 23, en la que el TNF es TNF-alfa.

5

25. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 21, en el que la etapa de contacto se realiza en ausencia de dodecilsulfato sódico, urea o guanidinio HCl.

26. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 21, en el que la etapa de contacto se realiza en una solución
10 esencialmente libre de caótropos.

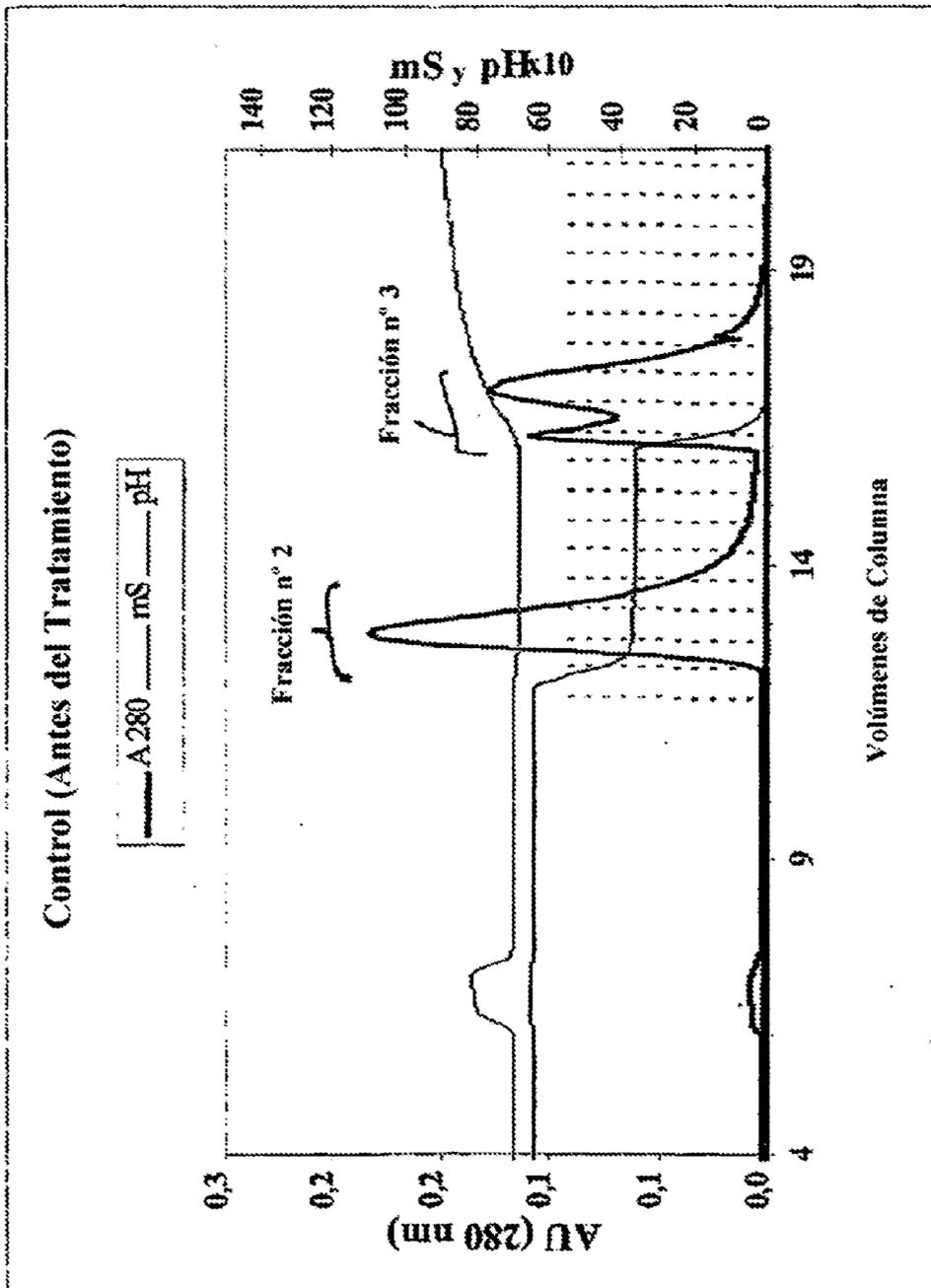


Figura 1

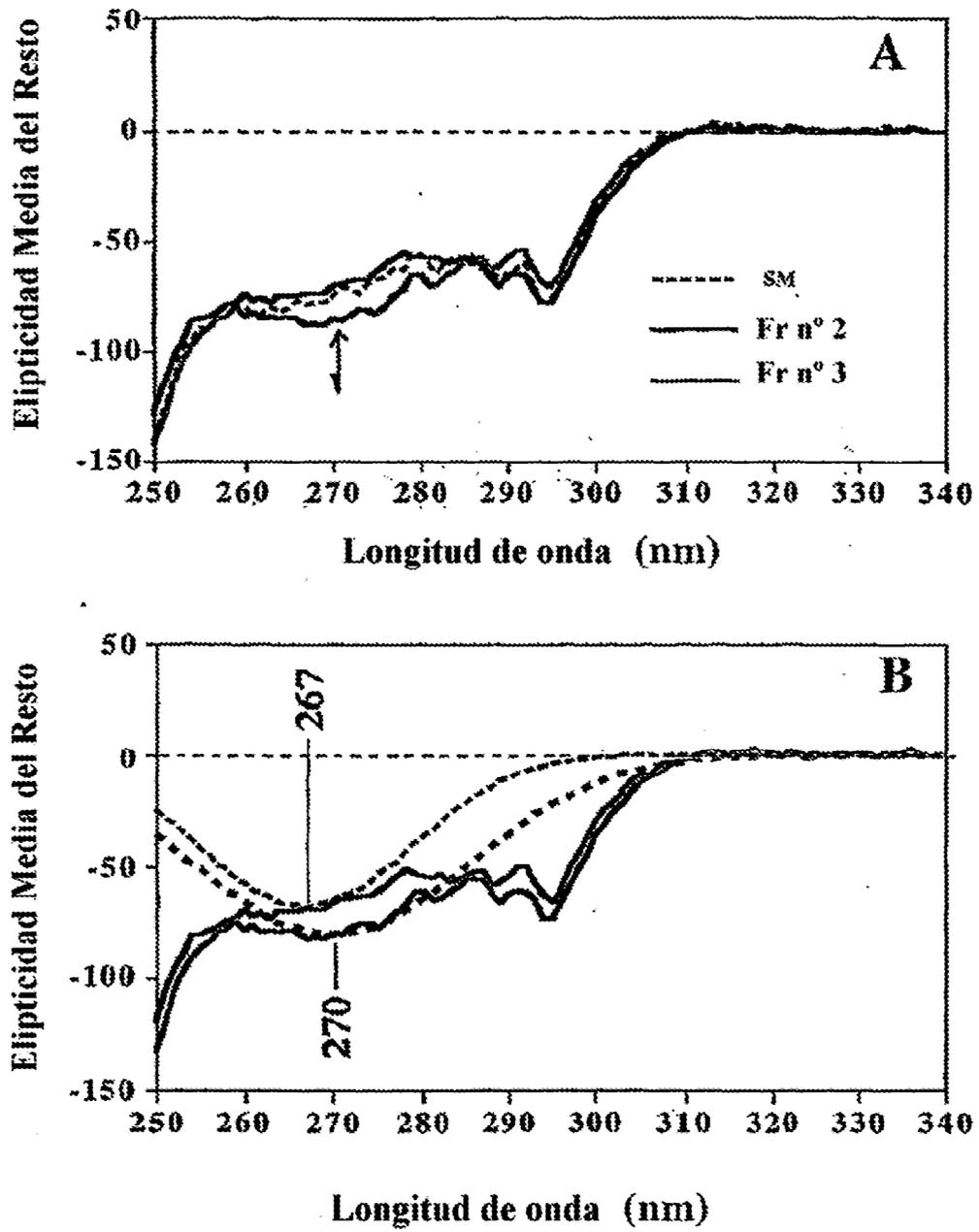


Figura 2

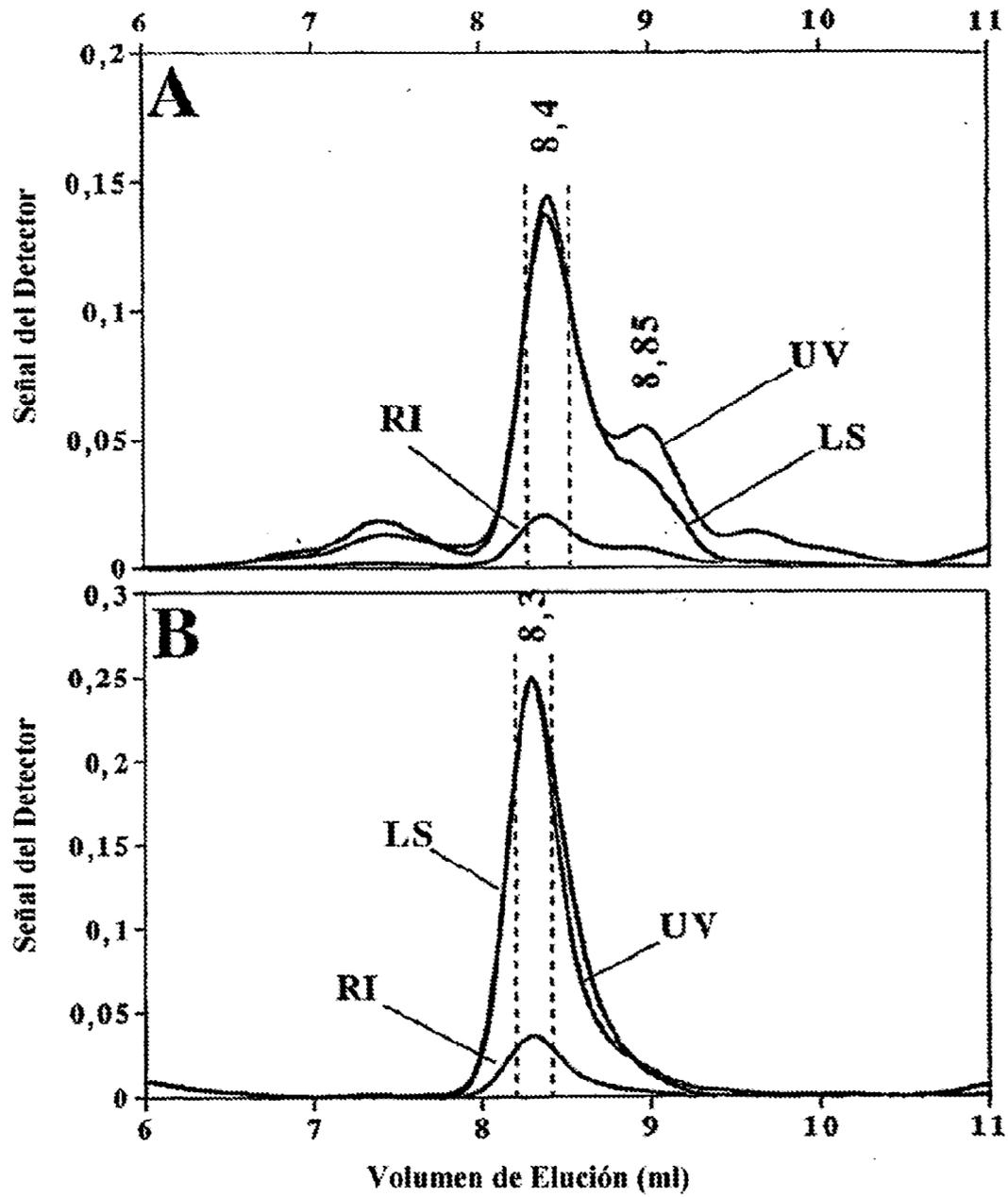


Figura 3

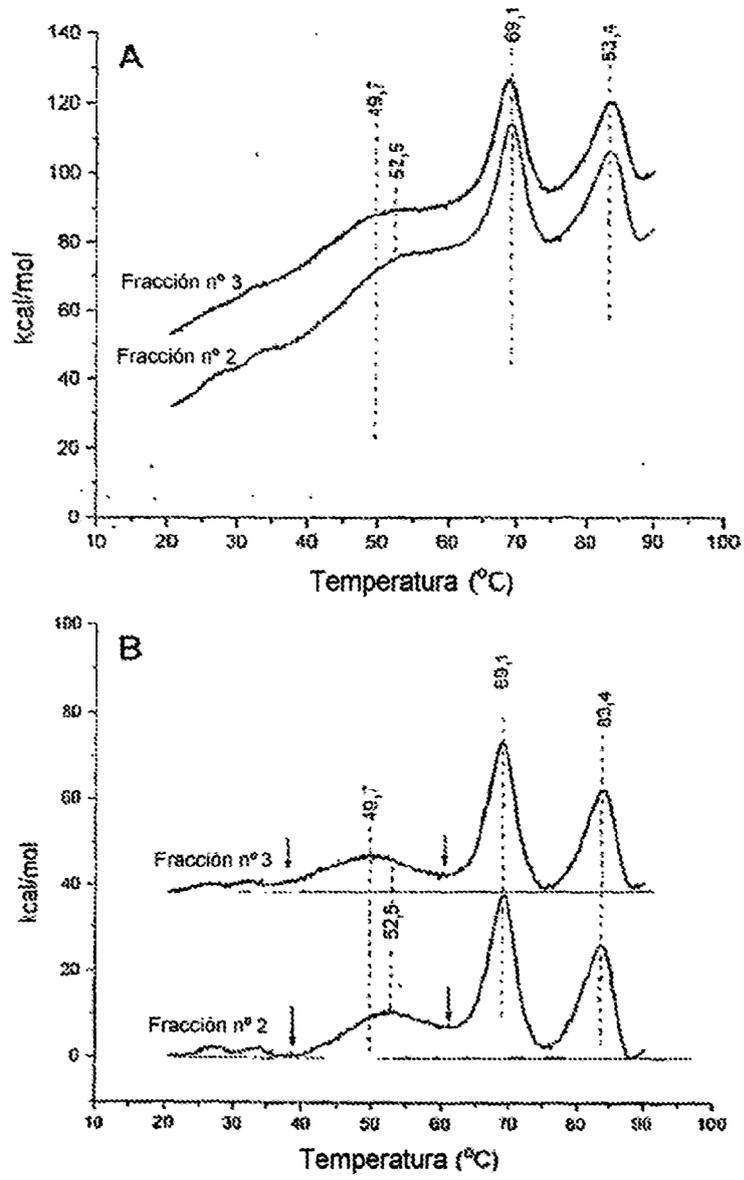


Figura 4

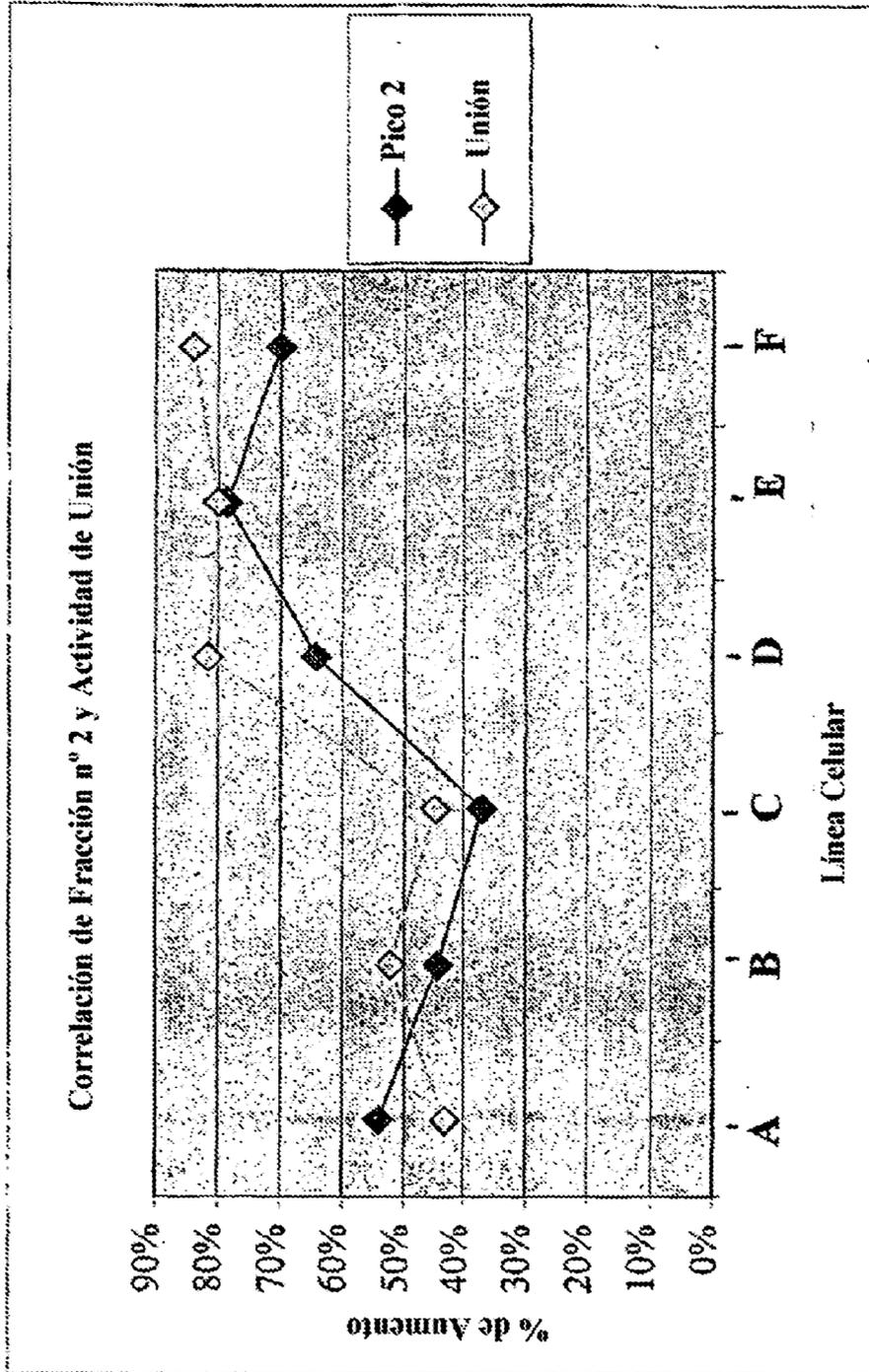


Figura 5

Figura 6

Efecto de Variar la Concentración de Cisteína sobre la Conversión de la Fracción n° 3 en la Fracción n° 2

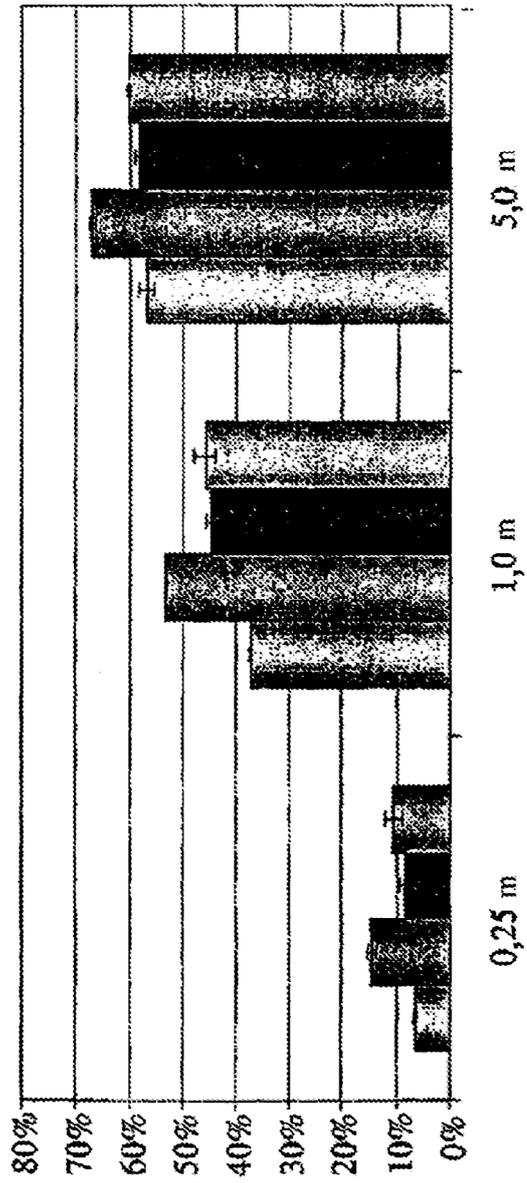


Figura 7

Efecto de la Concentración de Cisteína sobre la Proporción de Fracción n° 3

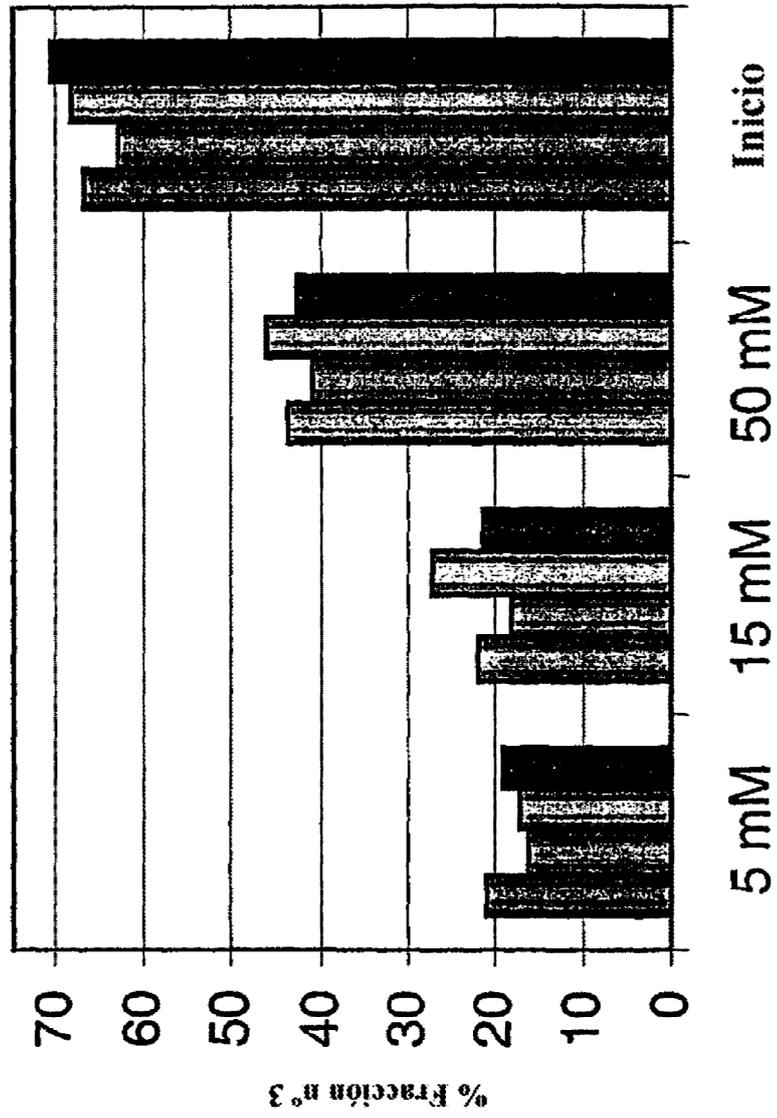


Figura 8A

Efecto de la Temperatura sobre la Fracción n° 3 después de 6 horas

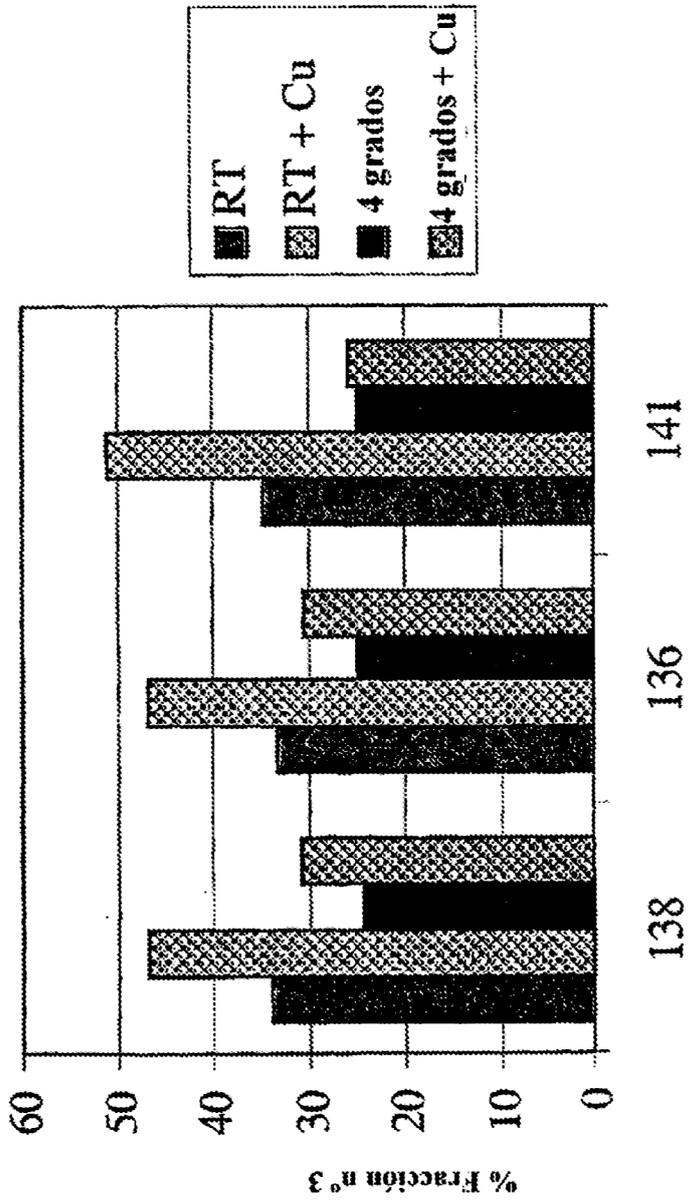
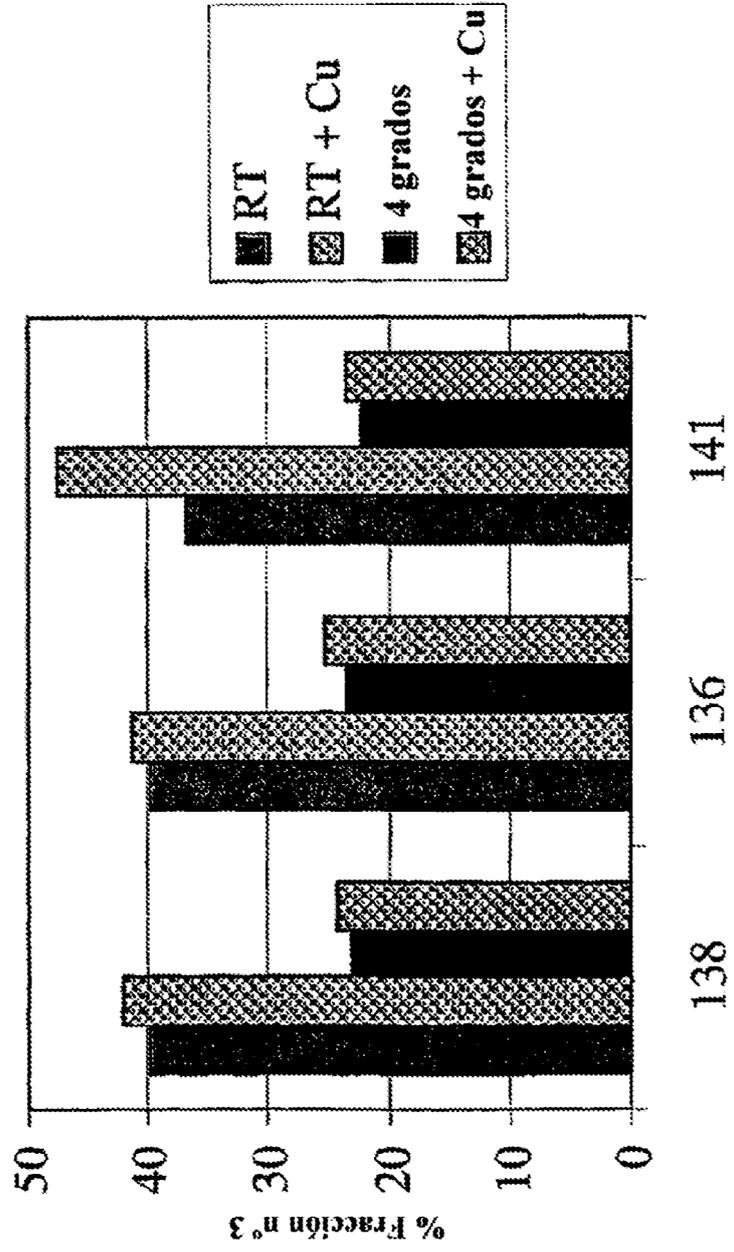


Figura 8B

Efecto de la Temperatura sobre la Fracción n° 3 después de 18 horas



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 9603141 A1 [0004]
- EP 0293785 A [0005]
- EP 0433225 A [0005]
- EP 0553494 A [0006]
- US 5272071 A, Chappel [0015]
- 15 • WO 9428391 A [0020]
- US 6087329 A [0020]
- WO 9701633 A [0020]
- AU 588819 [0020]
- EP 0460846 A [0021]
- 20 • US 4968607 A [0021]
- US 5767064 A [0021]
- EP 0367566 A [0021]
- US 6271349 B [0021]
- US 4816567 A, Cabilly [0024]
- 25 • EP 0125023 B1 [0024]
- US 4816397 A, Boss [0024]
- EP 0120694 B1 [0024]
- WO 8601533 A, Neuberger, M. S. [0024]
- EP 0194276 B1 [0024]
- 30 • US 5225539 A, Winter [0024]
- EP 0239400 B1 [0024]
- EP 0451216 B1 [0024]
- EP 0519596 A1, Padlan, E. A. [0024]
- WO 9308207 A [0026]
- 35 • WO 9640918 A [0026]
- US 4235871 A [0047]
- US 4501728 A [0047]
- US 4837028 A [0047]
- US 4737323 A [0047]
- 40 • US 6036978 A [0047]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 45 • **Flamand et al.** Purification and renaturation of Japanese encephalitis virus nonstructural glycoprotein NS1 overproduced by insect cells. Protein Expression and Purification, 1995, vol. 6, 519-527 [0006]
- Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, 1988 [0015]
- 50 • **Sambrook et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Laboratory Press, 1989 [0015]
- **Segal et al.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1999, vol. 96 (6), 2758-63 [0015]
- 55 • **Brasel et al.** Blood, 1996, vol. 88, 2004-2012 [0016]
- **Kaufman et al.** J. Biol. Chem, 1988, vol. 263, 6352-6362 [0016]
- 60 • **McKinnon et al.** J. Mol. Endocrinol, 1991, vol. 6, 231-239 [0016]
- **Wood et al.** J. Immunol, 1990, vol. 145, 3011-3016 [0016]
- **Urlaub et al.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0016]
- 65 • **Kaufman R.J.** Meth. Enzymol, 1990, vol. 185, 527-566 [0016]
- Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. Blackwell Sciences, 1998, vol. II [0020]
- 70 • Growth Factors: A Practical Approach. Oxford University Press Inc, 1993 [0020]
- The Cytokine Handbook. Academic Press, 1991 [0020]
- 75 • Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference. 1996 [0022]
- 80 • **Larrick et al.** Biotechnology, 1989, vol. 7, 934-938 [0024]
- **Reichmann et al.** Nature, 1988, vol. 332, 323-327 [0024]
- **Roberts et al.** Nature, 1987, vol. 328, 731-734 [0024]
- 85 • **Verhoeven et al.** Science, 1988, vol. 239, 1534-536 [0024]
- **Chaudhary.** Nature, 1989, vol. 339, 394-397 [0024]
- 90 • **Slack et al.** J. Biol. Chem., 1993, vol. 268, 2513-524 [0043]
- **Perczel et al.** Protein Engrg., 1991, vol. 4, 669-679 [0044] [0053] [0058]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1980 [0047]
- 95 • **Lakowicz, J.R.** Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, 1983, 342-343 [0054]
- **Arakawa et al.** Anal. Biochem., 1992, vol. 203, 53- 7 [0055]
- 100 • **Wen et al.** Anal. Biochem., 1996, vol. 240, 155-166 [0055]
- **Kahn, P.C.** Methods Enzymol., 1978, vol. 61, 339-378 [0057]
- 105 • **Kosen et al.** Biochemistry, 1981, vol. 20, 5744-5754 [0057]