

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 079**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)  
**C07K 1/18** (2006.01)  
**C12N 15/57** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**B01J 41/00** (2006.01)  
**B01J 39/00** (2006.01)  
**B01D 15/36** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 09013384 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2157177**

54 Título: **Proceso de purificación preparatoria de furina humana**

30 Prioridad:

**22.05.2007 US 931301 P**

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

**30.07.2013**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)  
ONE BAXTER PARKWAY  
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MATTHIESSEN, PETER;  
ROMEDER-FINGER, STEFAN;  
TURECEK, PETER y  
SCHWARZ, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 416 079 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso de purificación preparatoria de furina humana.

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a procesos de purificación de furina humana recombinante o de furina humana truncada utilizada para el procesamiento de proteínas precursoras inactivas con el fin de obtener proteínas maduras.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La familia de las convertasas proproteínicas análogas a la subtilisina de mamífero proteolíticas (SPC o PC) es homóloga a las subtilisinas bacterianas y de levadura Kex2p. Hasta la fecha se han identificado siete miembros distintos de la familia de las SPC, incluyendo furina, PC1 (también conocida como PC3), PC2, PACE4, PC4, PC5 (también conocida como PC6), PC7 (LPC, PC8 o SPC7). Cada una de ellas presenta una distribución tisular única.

15 Todas las SPC son enzimas multidominio, compuestas por un propéptido amino-terminal, un dominio catalítico similar a la subtilisina, un dominio medio y un término carboxi único compuesto por uno o más dominios. Los dominios propéptido, catalítico y medio son esenciales y suficientes para la actividad catalítica. Se cree que los dominios carboxi-terminales contienen información para dirigirse correctamente y concentrarse en el compartimento de la vía secretora en la que funcionan las enzimas.

Estas proteínas están implicadas en el proceso de maduración endoproteolítico de proteínas precursoras inactivas, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, receptores, proteínas virales y bacterianas y proteínas plasmáticas, como albúmina, factor von Willebrand (VWF), factor VII, factor IX y factor X, en sitios de consenso básico simples, emparejados o múltiples (Nakayama, *Biochem J.* 1997; 327: 625-35).

20 El miembro de las SPC furina, también llamado PACE (*paired basic amino acid cleavage enzyme* - enzima de disociación de aminoácidos básicos emparejados) se expresa en todos los tejidos y líneas celulares de mamíferos y es capaz de procesar una amplia gama de proteínas precursoras bioactivas en la vía secretora, incluyendo también hormonas, factores de crecimiento, receptores, proteínas virales y bacterianas y proteínas plasmáticas. Se trata de una endoproteasa de serina calcio-dependiente dispuesta estructuralmente en varios dominios, a saber: un péptido señal, propéptido, dominio catalítico, dominio medio (también denominado dominio homo-B o P), el dominio rico en cisteína situado en el extremo C, dominio transmembrana y cola citoplasmática. El sitio de disociación de la proteasa de furina incluye una secuencia de reconocimiento caracterizada por la secuencia de aminoácidos Arg-X-Lys/Arg-Arg (Hosaka y col., *J Biol Chem.* 1991; 266:12127-30).

30 Una furina intacta se incorpora en el sistema de membrana del aparato de Golgi, donde es funcionalmente activa (Bresnahan y col., *J Cell Biol.* 1990; 111: 2851-9). Con el tránsito del precursor de furina recién sintetizado desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, el propéptido se elimina autocatalíticamente en un procesamiento en dos etapas (Anderson y col., *EMBO J.* 1997; 16: 1508-18).

35 La furina también efectúa ciclos entre la red trans-Golgi y la superficie celular a través de las vesículas endosomales, procesando así las dos proteínas precursoras durante su transporte a través de la vía secretora constitutiva, así como moléculas que entran en la vía endocítica. La distribución celular de furina en los compartimentos de procesamiento está dirigida por características estructurales definidas dentro de su cola citoplasmática (Teuchert y col., *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 8199-07).

40 Dado que una sobreexpresión de la proteasa afecta negativamente al crecimiento de cultivos celulares de crecimiento continuo, se han buscado soluciones para reducir la influencia tóxica de la furina en las células. Se ha comprobado que los dominios C-terminales son prescindibles para la actividad funcional de la furina y se ha podido detectar una forma truncada de la furina nativa sobreexpresada de 75-80 kD en el sobrenadante celular como proteína segregada (Wise y col., *PNAS.* 1990; 87: 9378-82). Esta furina truncada segregada de forma natural también es conocida como "*shed furin*" (furina recortada) (Vidricaire y col, *Biochem Biophys Res Comm.* 1993; 195: 1011-8; Plaimauer y col., *Biochem J.* 2001; 354: 689-95) y está disociada en el extremo N de la porción transmembrana (Vey y col., *J Cell Biol.* 1994; 127: 1829-42).

50 Ya se han descrito proteínas de furina truncadas por ingeniería genética, donde se ha eliminado la parte codificadora de los dominios transmembrana y citoplasmático, por ejemplo para los aminoácidos  $\Delta$ 714-794 (Leduc y col., *J Biol Chem.* 1992; 267: 14304-8; Molloy y col., *J Biol Chem.* 1992; 267: 16396-402), para los aminoácidos  $\Delta$ 716-794 ("Sol-PACE", Wasley y col., *J Biol Chem.* 1993; 268: 8458-65; Rehemtulla y Kaufman, *Blood.* 1992; 79: 2349-55) y para los aminoácidos  $\Delta$ 705-794 (Hatsuzawa y col., *J Biol Chem.* 1992; 267: 16094-9). También se han descrito mutantes de furina que comprenden una delección de la región rica en cisteína (Hatsuzawa y col., *J Biochem.* 1992; 101: 296-301; Creemers y col., *J Biol Chem.* 1993; 268: 21826-34).

Para el uso biotecnológico *in vitro* se pueden concebir tanto aplicaciones *in vitro* como aplicaciones *in vivo* de SPC, incluyendo una aplicación dentro del marco del tratamiento terapéutico. Para estas aplicaciones, la furina humana o la furina truncada pueden ser más adecuadas que las endopeptidasas de origen no humano.

5 La furina o la furina truncada puede ser aplicable en la producción comercial de todo tipo de sustancias biológicamente activas (por ejemplo, otras enzimas) si ésta incluye un procesamiento como paso de producción. Por ejemplo, la Universidad de Leuven mantiene patentes para la aplicación de furina en la producción industrial de productos biomédicos relevantes (Pat. US nº 5.989.856, 5.935.815 y 6.274.365).

10 Otro ejemplo es el procesamiento de pro-VWF. En realidad, la actividad endoproteolítica de la furina y su selectividad por los aminoácidos básicos se determinó primero en experimentos con pro-VWF. El pro-VWF es un propolipéptido de 741 aminoácidos y un VWF maduro de 2.050 aminoácidos (Verweij y col., EMBO J. 1986; 5: 1839-47) y es procesado en su forma madura por furina producida de modo endógeno (Wise y col., PNAS 1990; 87: 9378-82; Van de Ven y col., Mol Biol Rep. 1990; 14: 265-75; Rehemtulla y Kaufman, Blood. 1992; 79: 2349-55). Dado que en el proceso aguas abajo el VWF recombinante (VWFr) consiste hasta en un 50-70% en pro-VWFr, el pro-VWFr no madurado por completo ha de ser procesado adicionalmente *in vitro*. La maduración de pro-VWFr se puede lograr mediante la adición de sobrenadante de células CHO con contenido en furina no purificada al sobrenadante de pro-VWFr no purificado. Sin embargo, debido a las bajas concentraciones de pro-VWFr y furina, este proceso de maduración puede llegar a durar varios días y no es bien reproducible. Por consiguiente, para este proceso de maduración sería preferible una furina purificada o un derivado de furina purificado.

20 A pesar del uso generalizado potencial de la furina o de la furina truncada en la maduración de proteínas, sorprendentemente sólo existen unas pocas descripciones de métodos para purificar furina.

La furina de ratón truncada recombinante ha sido purificada únicamente mediante un factor 7 con un rendimiento de un 27% por purificación con una membrana de intercambio aniónico seguida de columnas Mono Q y Superose 12 (Cameron y col., J Biol Chem. 2000; 275: 36741-9).

25 Hatsuzawa y col. (J Biol Chem. 1992; 267: 16094-9) lograron una purificación en un factor 100 de furina de ratón truncada en células CHO con un rendimiento relativamente bajo, de aproximadamente un 10%, utilizando fraccionamiento de sulfato de amonio, fraccionamiento por lotes con AF-Blue Toyopearl y cromatografía con DEAE-Toyopearl. El mismo método fue utilizado también por Nakayama y col., tal como se publicó en Methods Enzymol. 1994; 244: 167-75.

30 Bravo y col. (J Biol Chem. 1994; 269: 25830-25837) describen la purificación de furina humana truncada a partir de sobrenadante de células de insecto dializado mediante Q-sepharose.

35 Sin embargo, debido al uso de varios pasos consecutivos, todos estos métodos requieren un tiempo relativamente largo, tienen un bajo grado de purificación o presentan un bajo rendimiento en furina. Estos métodos de purificación de furina no son útiles para un proceso industrial a gran escala donde la furina sólo es necesaria por encima de la proteína a preparar. Por consiguiente, en la técnica existe una gran necesidad de un proceso rápido para la purificación de furina en combinación con un alto grado de purificación y un alto rendimiento. Un objetivo de la presente invención consiste en desarrollar un paso simple de purificación en una sola columna para furina recombinante o furina truncada humana con un alto rendimiento y un grado de purificación suficiente para permitir la maduración de proproteínas, por ejemplo pro-VWFr. Además se debería desarrollar un paso de purificación adicional subsiguiente para obtener una furina o furina truncada esencialmente pura.

#### 40 SUMARIO DE LA INVENCION

La furina, también llamada PACE (*paired basic amino acid cleavage enzyme* - enzima de disociación de aminoácidos básicos emparejados), que es un miembro de las convertasas proproteínicas similares a la subtilisina, es expresada en todos los tejidos y líneas celulares de los mamíferos y es capaz de procesar una amplia gama de proteínas precursoras bioactivas en la vía secretora. La furina o la furina truncada puede ser aplicable en la producción comercial de todo tipo de sustancia biológicamente activa si ésta incluye un procesamiento de proproteínas como paso de producción. A pesar del uso generalizado potencial de la furina o la furina truncada en la maduración de proteínas, sólo hay disponibles unos pocos métodos de purificación para la furina, que no son óptimos. Para desarrollar un método de purificación mejorado para la furina, una furina humana truncada recombinante se expresó en células CHO y se concentró en un factor de aproximadamente 50 mediante ultrafiltración y diafiltración. El concentrado pudo ser purificado mediante cromatografía en columna en Cpto-MMC™, lo que resultó en un factor de purificación de 30-50 y un rendimiento de al menos un 60%. La preparación de furina truncada con una pureza de al menos un 20% obtenida después de la cromatografía Cpto-MMC™ ya presentaba un grado de purificación que posibilitaba una maduración en columna de pro-factor von Willebrand. También se llevó a cabo una purificación adicional por cromatografía en arginina Sepharose. Los dos procesos en columna para la purificación de furina humana truncada condujeron a una preparación prácticamente pura con una actividad específica de aproximadamente 290.000 U furina/mg de proteína y un rendimiento de aproximadamente un 50%.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "furina" está bien definido en la técnica, pudiendo encontrarse ejemplos en la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL (nº de acceso P09958) y en una realización de la invención la furina representa el péptido dado a conocer en la Patente US nº 5.986.079 y codificado por las secuencias de ADN dadas a conocer en dicho documento.

El concepto "derivado de furina" incluye fragmentos truncados del aminoácido de furina (también conocido como "*shed furin*" (furina recortada)), variantes naturales o secuencias modificadas deliberadamente de los mismos. Por consiguiente, todas las proteínas generadas a partir de furina o del análogo de furina truncada mediante inserción, deleción o intercambio de aminoácidos y que tienen una actividad biológica similar a la de la furina pueden ser purificadas con los métodos aquí descritos.

La furina y el derivado de furina se pueden producir mediante tecnología recombinante, es decir, mediante la expresión de ADN codificador de dicha furina o del derivado de furina en una célula huésped apropiada transformada con dicho ADN.

Se puede obtener una furina truncada mediante truncamiento del ADN codificador de furina en su extremo 3' y/o su extremo 5' conservando al mismo tiempo las secuencias codificadoras de la actividad de furina endopeptidasa. Puede ser deseable eliminar la secuencia codificadora de la región transmembrana (TM) y/o la región rica en cisteína (CRR). También puede ser deseable eliminar la región codificadora de la secuencia de señal y/o sustituirla por una secuencia heteróloga. Una furina truncada a purificar en un método de acuerdo con la presente invención también puede incluir un dominio transmembrana putativo que puede servir para anclarla a las membranas del aparato de Golgi.

También puede ser deseable ligar una porción de la secuencia de ADN de furina (en particular una porción que incluye la región codificadora del dominio catalítico) a una secuencia codificadora heteróloga y, en consecuencia, crear un péptido de fusión con la especificidad enzimática de la furina.

En una realización preferente de la presente invención, la furina truncada es de origen humano y está truncada en el extremo C de modo que carece de los aminoácidos 578 a 794 de la secuencia de aminoácidos de la furina humana natural, tal como se describe por ejemplo en la Patente US nº 5.986.079. Una furina truncada a purificar en un método de acuerdo con la presente invención está truncada de modo que puede ser expresada en grandes cantidades en una célula sin ser esencialmente tóxica para ésta. Estas furinas truncadas son conocidas en la técnica.

Puede utilizarse una furina o una furina truncada purificada con los métodos dados a conocer en la presente invención para formar proproteínas mediante disociación proteolítica. El propósito es que las proproteínas incluyan todos los precursores de proteínas que pueden ser convertidos en proteínas funcionales con un tratamiento proteolítico adecuado. En particular, las proproteínas pueden ser proenzimas, pre-proenzimas u otros precursores (inactivos) de proteínas o enzimas a utilizar bioquímica, fisiológica o biotecnológicamente.

Ejemplos de polipéptidos precursores incluyen, de forma no exclusiva, factores de coagulación, como VWF, factor IX, proteína C, proteína S, protrombina, factor X, factor VII y proteína gamma-carboxiglutamato ósea, insulina, factores de crecimiento, como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de tejido nervioso (NGF).

La producción de una furina o de una furina truncada de acuerdo con la presente solicitud puede incluir cualquier método conocido en la técnica de ingeniería genética de ADN recombinante codificador de esta proteína, por ejemplo por transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN seguida por variados métodos de transfección de vectores y expresión recombinante de la proteína. Para ello se puede utilizar cualquier sistema de expresión eucariota usual, como diversos vectores, líneas celulares permanentes o sistemas de expresión virales. El ADN recombinante codificador de una furina, furina truncada o derivado de furina, por ejemplo un plásmido, también puede contener una secuencia de ADN codificadora de un marcador genético para seleccionar las células que han sido transfectadas satisfactoriamente con el plásmido.

Las líneas celulares para la producción recombinante de furina o furina truncada a purificar en un método de acuerdo con la invención se pueden producir mediante integración estable del ADN endógeno en el cromosoma de la célula huésped. El tipo de célula huésped puede ser cualquier célula eucariota. La célula puede ser una célula de mamífero con capacidad de realizar modificaciones postraduccion de una furina, furina truncada o derivado de furina. Por ejemplo, dicha célula de mamífero se deriva de una línea celular de mamífero, por ejemplo de una línea celular seleccionada de entre el grupo consistente en células SkHep, CHO, HEK293 y BHK. Como sistemas de expresión eucariota también se pueden utilizar levaduras y otros tipos de células que expresan furina endógena, furina truncada o derivados de furina. También es posible utilizar animales transgénicos para la expresión de una furina o de derivados de la misma. Las células CHO-DUXS B11 han demostrado ser particularmente adecuadas para la expresión de proteínas recombinantes (Urlaub y col., PNAS 1980; 77: 4216-20). Las células se pueden

cultivar a cualquier escala. En un ejemplo específico se cultivaron células CHO por fermentación quimiostática a una escala 80-200 L.

5 No existe ninguna limitación en cuanto a los medios, reactivos y condiciones utilizados para cultivar las células. Las células se pueden cultivar de forma continua o por lotes con suero, pero también bajo condiciones libres de suero o libres de suero y proteínas.

10 Una furina a purificar en un método de acuerdo con la presente invención se puede aislar de células mediante lisis y purificar adicionalmente mediante métodos convencionales, opcionalmente en presencia de inhibidores de proteasa. La furina es activa en un medio relativamente ácido, a pH 5,5, como ocurre en los gránulos secretorios, pero la proteína mantiene su actividad también a pH 7,5. La actividad de la furina depende de la presencia de iones  $\text{Ca}^+$ . Se ha comprobado que para la actividad enzimática *in vitro* es óptima una concentración de calcio de 2-5 mM. La presencia de quelantes metálicos, como EDTA, inhibirá en gran medida la actividad de la furina.

15 La evaluación de la actividad proteolítica de una furina, furina truncada o derivado de furina se puede llevar a cabo mediante cualquier análisis apropiado, por ejemplo utilizando sustratos fluorogénicos que incluyen un sitio de disociación dibásico para el que es específica la furina (Scholokat y col., *Biotechnol Appl Biochem.* 1996; 24: 257-67). En este ensayo, 1 Unidad se define como la cantidad de furina que libera 1 pmol de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) del sustrato fluorogénico Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC en 1 minuto a 30°C. Alternativamente, la actividad proteolítica también se puede medir incubando la furina con proproteínas, por ejemplo pro-VWFr, durante tiempo suficiente. El grado de procesamiento de pro-VWFr se puede analizar por ejemplo mediante *Western blotting*.

20 La presente invención proporciona un método para purificar furina del medio de cultivo celular producida de forma recombinante. Una furina, furina truncada o derivado de furina se puede purificar sorprendente y ventajosamente por medio de una resina de intercambio aniónico con potencial para unirse a la furina a pH 6,0, como geles de cromatografía estables a la presión Fractogel TMAE® EMD 650M (Merck, Darmstadt, Alemania) y Capto Q™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemania).

25 Se ha comprobado que Capto Q™ es sorprendentemente eficiente para la captura y purificación intermedia de alta expresión y grandes volúmenes de alimentación de furina, furina truncada o derivado de furina. La matriz altamente rígida permite un intervalo de trabajo más amplio de velocidades de flujo, alturas de lecho y viscosidad de muestra, todos ellos aspectos que influyen positivamente en los costes de procesamiento. Las altas velocidades de flujo aumentan el rendimiento volumétrico y reducen el tiempo de proceso; las alturas de lecho mayores eliminan la necesidad de un equipo grande y mantienen las huellas pequeñas; y un procesamiento de alto flujo de muestras viscosas significa menos dilución y tiempos de ciclo más cortos.

30 En otra realización de la presente invención se utilizó la resina Capto-MMC™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemania). Sorprendentemente, el uso de dicha resina permitió obtener altos factores de purificación de 30-50, altos rendimientos de al menos un 60% y una actividad específica de al menos 100.000 U/mg de proteína con un único paso de purificación.

35 En otra realización de la presente invención, una furina truncada purificada en una resina Capto-MMC™ se purificó adicionalmente en una resina de arginina Sepharose tal como una columna Arginine-Sepharose 4B™ (GE Healthcare). Empleando estas dos resinas se pudo obtener sorprendentemente un alto factor de purificación de 140, altos rendimientos de un 50%, un factor de purificación de aproximadamente 140, una pureza de al menos un 90-95% y una actividad específica de 290.000 U/mg.

40 Para tamponar la furina, furina truncada o derivados de furina y equilibrar las columnas utilizadas en la presente invención se pueden utilizar diversos sistemas tampón. En general se puede utilizar cualquier tampón que tenga capacidad de regulación a pH 6,0. Esto incluye, por ejemplo, tampones fosfato, citrato y Tris. En una realización de la presente invención el tampón es Hepes 50 mM /  $\text{CaCl}_2$  1 mM, y en otra realización el tampón es acetato de sodio 10 mM /  $\text{CaCl}_2$  1 mM. El pH oscila entre 5,5 y 8,0 y en otra realización el pH es 6,0.

45 Aquí también se da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad endoproteolíticamente activa de una furina o de una furina truncada purificada de acuerdo con la presente invención, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser preferentemente una formulación líquida y preferiblemente es una solución acuosa tamponada isotónica. Una furina o furina truncada purificada de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar como una preparación farmacéutica que incluye un polipéptido de furina en forma de una preparación de un solo componente, o en combinación con otros componentes en forma de un sistema multi-  
50 componente, por ejemplo proproteínas de VWF.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen excipientes, como diluyentes y similares, y aditivos, como estabilizantes, conservantes, solubilizantes y similares. Los polipéptidos purificados según un método de esta invención también se pueden presentar en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por un organismo regulador de un gobierno de EEUU o de la UE, o incluido en la lista de la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea reconocida para uso en animales, y en particular en humanos.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención, pero no limitan en modo alguno su alcance.

## 5 FIGURAS

- Figura 1: muestra la purificación de una furina truncada por cromatografía en columna Capto MMC™ utilizando elución escalonada (Ejemplo 5).  
 Figura 2: muestra la purificación de una furina truncada por cromatografía en columna Capto MMC™ utilizando elución por gradiente (Ejemplo 5)  
 10 Figura 3: muestra la purificación de una furina truncada obtenida de una cromatografía en columna Capto MMC™ con una cromatografía adicional con arginina Sepharose (Ejemplo 6).  
 Figura 4: muestra la separación por SDS-PAGE de una furina truncada purificada por columnas Capto MMC™ y Capto MMC™ en combinación con arginina Sepharose (Ejemplo 2 y Ejemplo 6).

## 15 EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Expresión y análisis de furina truncada recombinante

Una furina humana truncada carente de los aminoácidos 578 a 794 (SEQ ID N°: 1) se expresó en células CHO cultivadas mediante fermentación quimioestática a escala 80-200 L. Se concentró el sobrenadante de células CHO con contenido en furina a un factor de aproximadamente 50 (unidad de ultrafiltración con una membrana Hydrosart 20 30 kDa de 0,6 m<sup>2</sup>, Sartorius Göttingen, Alemania), se diafiltró contra Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, y se conservó a -20°C hasta su uso (en un plazo de una semana).

El contenido proteínico de las muestras se midió de acuerdo con el principio descrito por Bradford (Anal Biochem. 1976; 72: 248-54) utilizando el Protein Assay Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU). El procedimiento de microensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se calibró 25 utilizando una preparación de suero humano certificada (Qualitrol HS-N, DiaSys Diagnostics, Holzheim, Alemania), obteniendo un rango de calibración de 10 a 1,8 µg de proteína/ml. Las muestras concentradas se diluyeron en NaCl al 0,9%.

La actividad de furina enzimática se determinó en un ensayo fluorogénico. En este ensayo, 1 Unidad se define como la cantidad de furina que libera 1 pmol de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) del sustrato fluorogénico Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC en 1 minuto a 30°C. Una furina recombinante estándar (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) se diluyó 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 en Hepes 100 mM, 0,5% Triton X-100, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7,5. Ciento cincuenta µl de las muestras diluidas se agitaron con 50 µl de sustrato (Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC, sal acetato; Bachem Distribution Service GmbH; Weil am Rhein, Alemania) durante 120 minutos a 30°C en una placa de microtitulación negra para aplicaciones de fluorescencia. La liberación de AMC se midió en un 35 espectrofotómetro de fluorescencia a 360 nm/460 nm en un plazo de 10 minutos después de la incubación. Las concentraciones de furina se calcularon utilizando una curva de referencia con furina.

Las proteínas de CHO contaminantes se determinaron en un formato de ensayo ELISA en sándwich de dos sitios utilizando un anticuerpo de detección en exceso y una técnica inmune multicapa de incubación simple SIMIT (Naser, Immunol Methods. 1990; 129: 151-7). Se preparó un antígeno de célula huésped a partir de sobrenadante de cultivo celular de la línea celular CHO progenitora no recombinante DUKX. También se desarrollaron anticuerpos policlonales contra los antígenos de célula huésped en cabra. Para el revestimiento se utilizó una solución 1:500 de anticuerpo anti-CHO de cabra (preparación propia) en tampón de revestimiento (carbonato de sodio 100 mM, bicarbonato de sodio 100 mM, ajustado a pH 9,5 con HCl). Para diluir y bloquear las muestras se utilizó PBST (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, dihidrogenofosfato de potasio 1,5 mM, hidrogenofosfato disódico deshidratado 7 mM, Tween 20 0,5 mL, 0,1% seroalbúmina bovina y benzamidina 2 mM). Para la detección se empleó una combinación de anticuerpo biotinilado propio (biotina anti-CHO de cabra) y estreptavidina-peroxidasa (Dako, Glostrup, Dinamarca) 45 utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato. La preparación de células huésped purificada por afinidad se utilizó como patrón de ensayo (patrón de ensayo CHO-proteína, 380 ng/ml, preparación propia) cubriendo un rango de calibración de ensayo de 95 mg/ml a 3 ng/ml de proteína de CHO. Las muestras se 50 determinaron después de la transformación logarítmica de las OD y las concentraciones de proteína de CHO de las diluciones estándar y el cálculo de una curva de regresión lineal.

El contenido en endotoxinas de una preparación de furina truncada se determinó en un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL). El LAL contiene un sistema enzimático que se activa en presencia de endotoxinas. En pocas palabras: las enzimas activadas separan la para-nitroanilina (pNA) del sustrato cromógeno S-2423 (Ac-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA.HCl, CoaChrom Diagnostica GmbH, Viena, Austria) dando un color amarillo. La liberación de pNA 55

se mide cinéticamente en un lector ELISA a 405 nm. La concentración de endotoxina se calcula utilizando una curva de referencia con patrón de endotoxina (*E. coli* 0111:B4).

### Ejemplo 2 - Identificación de resina Capto-MMC™ como un paso de purificación en columna simple

5 Una furina truncada expresada y analizada tal como se describe más arriba se purificó en comparación sobre diferentes resinas cromatográficas no utilizadas previamente para la preparación de furina o furina truncada. Dos resinas de intercambio aniónico, Fractogel TMAE® (trimetilaminoetil)-EMD 650M (Merck, Darmstadt, Alemania) y Capto Q™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y un gel mixto de intercambio catiónico / interacción hidrofóbica (Capto MMC™) (GE Healthcare) se analizaron en cuanto al potencial de purificación concentración de furina truncada derivada de sobrenadante de células CHO. Las pasadas de cromatografía se llevaron a cabo con tampón Hepes 50 mM / CaCl<sub>2</sub> 1 mM a pH 7,5 (TMAE® y Capto Q™) y 5,5 - 8,0 (Capto MMC™). La carga de columna de furina truncada y la conductividad se variaron para las pasadas cromatográficas individuales (Tabla 1). La furina unida se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM en tampón de carga dentro de 15 CV. Se ha de señalar que todas las muestras de furina truncada preparadas estaban libres de endotoxinas.

**Tabla 1 Comparación de la purificación de furina truncada con diferentes resinas cromatográficas**

Columna	Carga (U/ml gel)	Conductividad (ms/cm)	Recuperación (%)	Actividad especif. (U/mg)	Purificación (factor)	Eliminación de CHO (factor)
TMAE	2.705	6,7	36	n.d.	n.d.	1,3
TMAE	4.016	5,2	57	2.248	2,4	1,7
TMAE	4.403	4,8	46	2.533	3,0	1,7
TMAE	10.635	5,2	37	2.049	2,5	2,4
TMAE	32.625	5,0	68	10.011	5,3	2,4
Capto Q	16.847	4,5	45	8.797	7,4	5,5
Capto Q	33.781	4,8	51	14.138	8,9	5,0
Capto Q	21.860	4,5	71	7.789	7,1	4,5
Capto MMC	5.358	4,3	56	38.611	30,3	96
Capto MMC	13.218	3,9	63	110.424	37,6	56
Capto MMC	6.972	7,8	76	27.693	27,1	45

15 Dado que los resultados de las diferentes columnas eran relativamente homogéneos dentro de cada grupo, se calcularon los valores medios para una mejor visión de conjunto. La Tabla 2 muestra los valores medios de los 5 experimentos con TMAE®, 3 con Capto Q™ y 3 con Capto MMC™, respectivamente.

**Tabla 2 Sinopsis de la comparación de la purificación de furina truncada con diferentes resinas cromatográficas**

Columna	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (factor)	Eliminación de CHO (factor)
TMAE	49	4.210	3,3	1,9
Capto Q	56	10.241	7,8	5,0
Capto MMC	65	58.909	32	66

Mientras que el TMAE® y el Capto Q™ pudieron aumentar la pureza de la furina truncada en un factor de 3 y 8, respectivamente, el Capto MMC™ condujo a un factor de purificación 32. El rendimiento de furina truncada en el eluato de la columna fue de un 65% para Capto MMC™, 56% para Capto Q™ y 49% para TMAE®.

25 Además del alto factor de purificación de furina truncada, el uso de Capto MMC™ también condujo al mayor factor de eliminación de proteínas de CHO contaminantes. De acuerdo con una medida realizada con bandas teñidas con Coomassie en un gradiente de un 8 - 18% de SDS-gel, la furina truncada presentaba una pureza de al menos el 20%. La Figura 4 muestra ejemplos típicos: en las vías 4-7 se cargaron 3 µg de diferentes preparaciones de furina truncada de eluatos de Capto-MMC™ (vía 1: patrón de furina, vías 2 y 3: eluatos de arginina Sepharose, M = marcador de peso molecular).

### Ejemplo 3 - Sustitución de tampón Hepes por tampón de acetato de sodio

35 Para reducir el coste del tampón (aproximadamente 500 € por columna de 1 litro) se analizaron sistemas tampón alternativos. No fue posible reducir la concentración de Hepes, ya que esto conducía a una penetración sustancial de furina truncada en la fracción de flujo y lavado. Las columnas Capto MMC™ se cargaron con 5.000-30.000 U furina/ml gel y se eluyeron utilizando un gradiente de NaCl 0-500 mM en tampón de carga con 15 CV. Se analizaron varios sistemas tampón y se comprobó que el acetato de sodio 10 mM permitía alcanzar un factor de purificación,

rendimiento y capacidad al menos similares en comparación con el tampón Hepes 50 mM. La Tabla 3 muestra los valores medios de los tres experimentos utilizando Hepes o tampón de acetato de sodio.

**Tabla 3 Comparación de Hepes y tampón de acetato de sodio**

Tampón	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (factor)	Eliminación de CHO (factor)
Hepes	65	58.909	32	66
Acetato de sodio	95	50.951	24	30

**5 Ejemplo 4 - Optimización de la purificación de furina truncada en columnas Cpto MMC™ por modificación de la conductividad**

Las columnas Cpto MMC se cargaron con 70.000 - 100.000 U furina/mg gel. La solución de carga se dializó contra acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, lo que resultó en una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm. Mediante el ajuste de la conductividad a 1 mS/cm, las pérdidas de furina truncada en las fracciones de flujo y lavado de la columna Cpto MMC se pudieron reducir considerablemente de aproximadamente un 17% a un nivel no detectable. Además, la carga de la columna se pudo aumentar hasta cerca de 100.000 U furina/ml gel (Tabla 4). Después de la aplicación de 150.000 U furina/ml gel se observó una pérdida sustancial de furina truncada. No obstante, es de esperar que la carga de la columna se pueda aumentar a 150.000 U/ml gel durante la optimización para la preparación a gran escala.

**15 Tabla 4 Purificación de furina truncada en columnas Cpto MMC™ con una conductividad de 1 mS/cm**

Carga de furina (U/ml gel)	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (factor)	Eliminación de CHO (factor)
105.700	19	57.692	23,7	18,8
70.400	97	96.896	37,7	29,4
74.700	94	138.299	55,3	41,8
91.500	90	140.866	53,8	n.d.
<b>Promedio</b>	<b>61</b>	<b>87.474</b>	<b>34,4</b>	<b>22,9</b>

**Ejemplo 5 - Recuperación de furina truncada de columnas Cpto MMC™ por elución en gradiente o escalonada**

Para aumentar la solidez de la cromatografía en columna, el gradiente de cloruro de sodio para la elución de furina truncada fue sustituido por gradientes escalonados. Aproximadamente 80.000 U/ml gel (gradiente) y 30.000 U/ml gel (gradiente escalonado) de furina truncada (dializada contra acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0) se cargaron en una columna Cpto MMC™. Las pasadas de cromatografía se llevaron a cabo con tampón de acetato de sodio 10 mM / CaCl<sub>2</sub> 1 mM a pH 6. Además de la elución por gradiente de NaCl 0-500 mM en tampón de carga de acetato de sodio dentro de 15 volúmenes de columna, también se llevo a cabo un paso de lavado adicional con tampón de equilibrado que contenía cloruro de sodio 30 mM y elución con cloruro de sodio 230 mM en el mismo tampón. La columna se lavó con 30 volúmenes de tampón de equilibrado y después con 10 volúmenes de tampón de equilibrado que contenía cloruro de sodio 30 mM. La furina truncada se eluyó con 14 volúmenes de tampón de equilibrado que contenía cloruro de sodio 230 mM. Se recogieron los 3 primeros volúmenes del eluato de cloruro de sodio 230 mM. Esto condujo a un menor factor de purificación y una menor concentración absoluta de furina truncada en el eluato. La Tabla 5 muestra el valor medio de 2 experimentos, respectivamente. En cambio, la recogida máxima de la furina truncada eluida (Figura 1) de la elución escalonada fue mejor en comparación con la recogida máxima obtenida con la elución por gradiente (Figura 2).

**35 Tabla 5 Elución por gradiente o por gradiente escalonado de furina truncada de columnas Cpto MMC™**

Elución	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (factor)
Gradiente	92	139.592	55
Gradiente escalonado	92	31.725	14

**Ejemplo 6 - Purificación adicional en columna de arginina-Sepharose de furina truncada eluida de columnas Cpto MMC™**

Una preparación de furina truncada con una pureza de al menos un 20%, obtenida después de cromatografía en Cpto-MMC™, tenía ya un grado de purificación que permitía una maduración en columna de pro-VWF. Para lograr

un mayor factor de purificación se puede llevar a cabo una purificación adicional por cromatografía en arginina-Sepharose.

- 5 Un eluato que contenía furina truncada del paso de cromatografía en Capto-MMC™ se dializó contra tampón Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,0, y aproximadamente 33.000 U furina/ml gel se cargaron en una columna Arginine-Sepharose 4B™ (GE Healthcare) equilibrada en el mismo tampón. La furina truncada se eluyó con un gradiente de NaCl 0-250 mM en tampón de equilibrado dentro de 25 volúmenes de columna. La Figura 3 muestra la pasada de cromatografía. Un pico de furina truncada que se eluye con aproximadamente BaCl 60 mM se concentró en un factor 5 por ultrafiltración utilizando una membrana de polisulfona de corte 10 kDa y se ajustó a NaCl 150 mM. Después de filtración estéril sobre Sartobran P (Sartorius, Göttingen, Alemania), la furina truncada se conservó a -20°C.
- 10 La actividad específica de la furina truncada era de aproximadamente 290.000±60.000 U/mg proteína (n = 3). El rendimiento global en comparación con el sobrenadante de fermentación como material de partida fue de aproximadamente un 50% (n = 3), el factor de purificación total fue de aproximadamente 140 y la pureza de al menos un 90-95%, determinada mediante tinción con Coomassie antes de ultraconcentración (Figura 4, vía 3) y después de ultraconcentración (Figura 4, vía 2).
- 15 De acuerdo con los ejemplos mostrados en la presente invención, el mejor método para purificar una furina truncada consiste en ajustar aproximadamente 150 millones de unidades de un concentrado de furina truncada (80.000 - 100.000 U/ml gel) a pH 6,0±0,1 y aplicarlas a una columna BPG100/20 Capto-MCC™ de 1,5 litros equilibrada contra acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0. La columna se lava con 30 volúmenes de tampón de equilibrado y después con 10 volúmenes de tampón de equilibrado que contiene cloruro de sodio 30 mM. La furina truncada se eluye con 14 volúmenes de tampón de equilibrado que contiene cloruro de sodio 230 mM. La recogida de los 3 primeros volúmenes de eluato de cloruro de sodio 230 mM da como resultado la solución de furina más concentrada. Si se desean mayores grados de purificación, es posible llevar a cabo una purificación adicional por cromatografía con arginina Sepharose.
- 20

**Listas de secuencias del archivo de referencia nº 6382**

- 25 SEQ ID Nº: 1  
Furina truncada

MELRPWLLWV	VAAITGTLVLL	AADAQQQKVF	TNTWAVRIPG	GPAVANSVAR	KHGFLNLGQI	60
PGDYHFWHR	GVTKRSLSPH	RPRHSRLQRE	PQVQWLEQQV	AKRRTKRDVY	QEPTDPKFPQ	120
QWYLSGVTQR	DLNVKAAWAQ	GYTGHGIVVS	ILDDGIEKNH	PDLAGNYDPG	ASFDVNDQDP	180
DPQPRYTQMN	DNRHGTRCAG	EVAAVANNGV	CGVGVAYNAR	IGGVRMLDGE	VTDAVEARSL	240
GLNPNHIHIY	SASWGPEDOG	KTVDGPARLA	EEAFFRGVSQ	GRGGLGSIFV	WASGNGGREH	300
DSCNCDGYTN	SIYTLSSISA	TQFGNVPWYS	EACSSTLATT	YSSGNQNEKQ	IVTDDLKQKC	360
TESHTGTSAS	APLAAGIIAL	TLEANKNLTW	RDMQHLLVVQT	SKPAHLNAND	WATNGVGRKV	420
SHSYGYGLLD	AGAMVALAQN	WTTVAPQRKC	IIDILTEPKD	IGKRLEVRKT	VTACLGEPNH	480
ITRLEHAQAR	LTLNRRRGD	LAIHLVSPMG	TRSTLLAARP	HDYSADGFND	WAFMTTHSWD	540
EDPSGEWVLE	IENTSEANNY	GTLTKFTLVL	YGTAPEG			577

LISTA DE SECUENCIAS

- 30 <110> Baxter International Inc. y col.  
<120> Proceso de purificación preparatoria de furina humana  
<130> B 2827EU
- 35 <150> US 60/931,301  
<151> 2007-05-22
- <160> 1
- 40 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 577  
<212> PRT
- 45 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Furina truncada
- 50 <400> 1

ES 2 416 079 T3

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr  
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn  
 20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val  
 35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr  
 50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu  
 85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu  
 100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr  
 115 120 125  
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly  
 130 135 140  
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn  
 165 170 175  
 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn  
 180 185 190  
 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn  
 195 200 205  
 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val  
 210 215 220  
 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro  
 245 250 255  
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu  
 260 265 270  
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile  
 275 280 285  
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn  
 290 295 300  
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala  
 305 310 315 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr  
 325 330 335  
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val  
 340 345 350  
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser  
 355 360 365  
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala  
 370 375 380  
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val  
 405 410 415  
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly  
 420 425 430  
 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg  
 435 440 445  
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg  
 450 455 460  
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His  
 465 470 475 480  
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg  
 500 505 510  
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe  
 515 520 525

ES 2 416 079 T3

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser  
530 . 535 540 .

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr  
545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu  
565 570 575

Gly

**REIVINDICACIONES**

1. Método para purificar un polipéptido de furina o un polipéptido de furina truncada a partir de una solución proteínica, que comprende los siguientes pasos:
  - 5 a) unir dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada a una resina mixta de intercambio catiónico/interacción hidrófoba con potencial para unirse al polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada a pH 6,0, y
  - b) recuperar el polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada de la resina por elución.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho polipéptido de furina truncada es el polipéptido de furina de acuerdo con la SEQ ID N°: 1.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la elución es una elución escalonada.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada se une a dicha resina mixta de intercambio catiónico/interacción hidrófoba en acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, se lava con cloruro de sodio 30 mM, acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, y se eluye con cloruro de sodio 230 mM, acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada se une a dicha resina mixta de intercambio catiónico/interacción hidrófoba en Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, se lava con cloruro de sodio 30 mM, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0, y se eluye con cloruro de sodio 230 mM, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la elución es una elución por gradiente.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho gradiente es NaCl 0-500 mM en acetato de sodio 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,0.
8. Método para la recuperación de un polipéptido de furina o un polipéptido de furina truncada, que comprende los siguientes pasos:
  - 25 a) unir dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada a una resina mixta de intercambio catiónico/interacción hidrófoba,
  - b) eluir dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada de la resina mixta de intercambio catiónico/interacción hidrófoba,
  - 30 c) unir el polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada eluido a resina de arginina-Sepharose, y
  - d) eluir dicho polipéptido de furina o polipéptido de furina truncada de la resina de arginina-Sepharose.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho polipéptido de furina truncada tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 1.

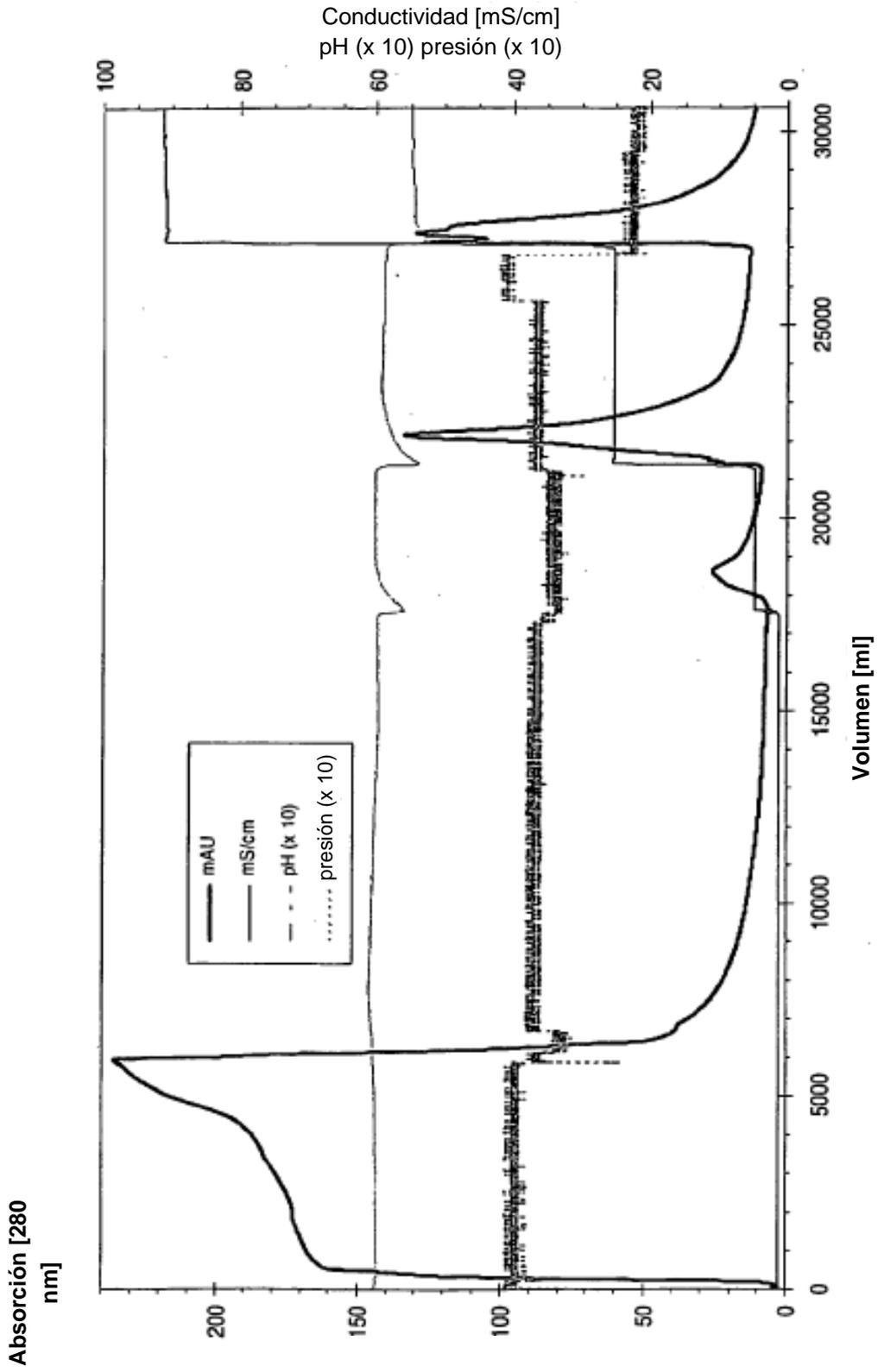


Figura 1

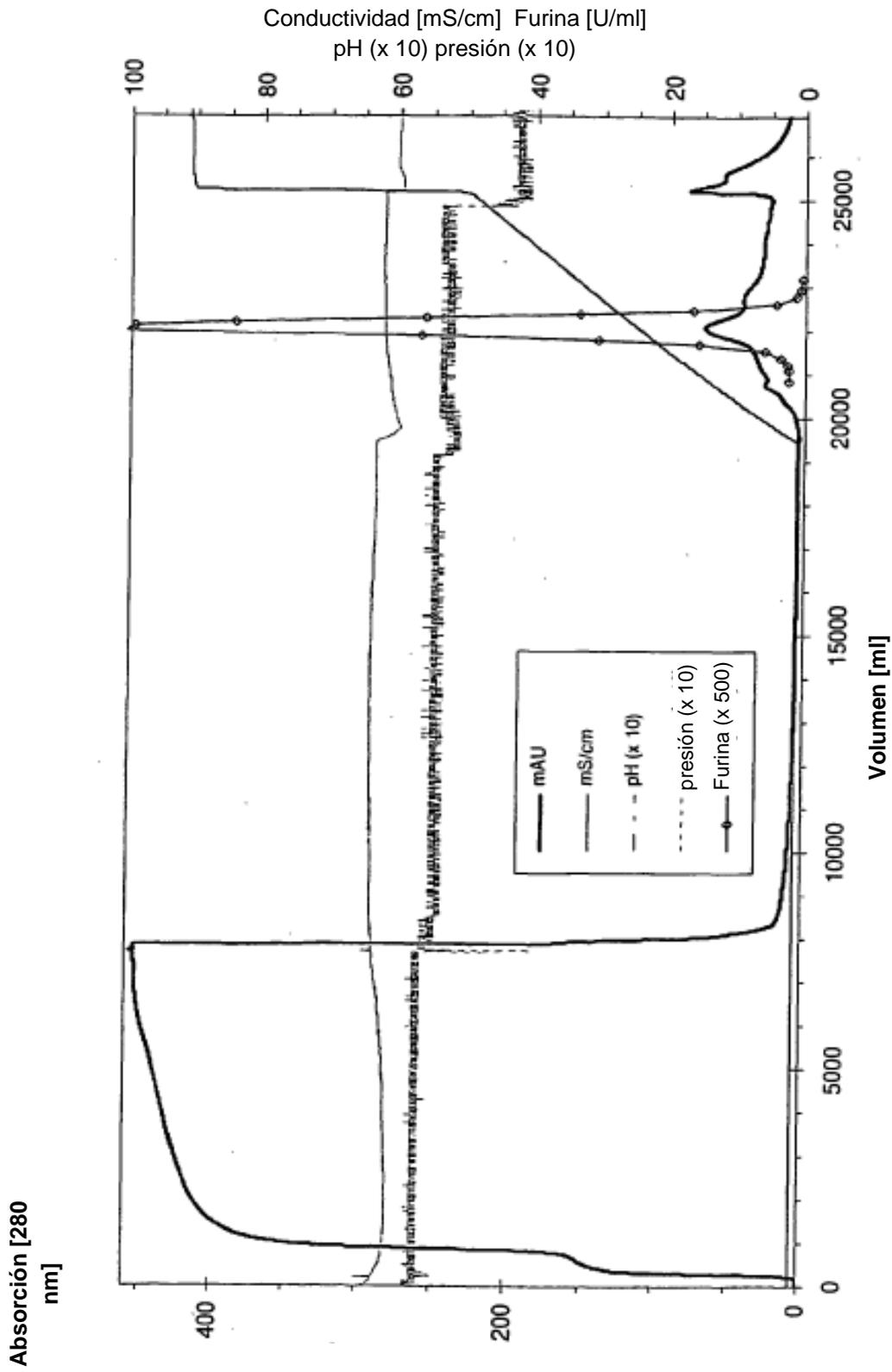


Figura 2

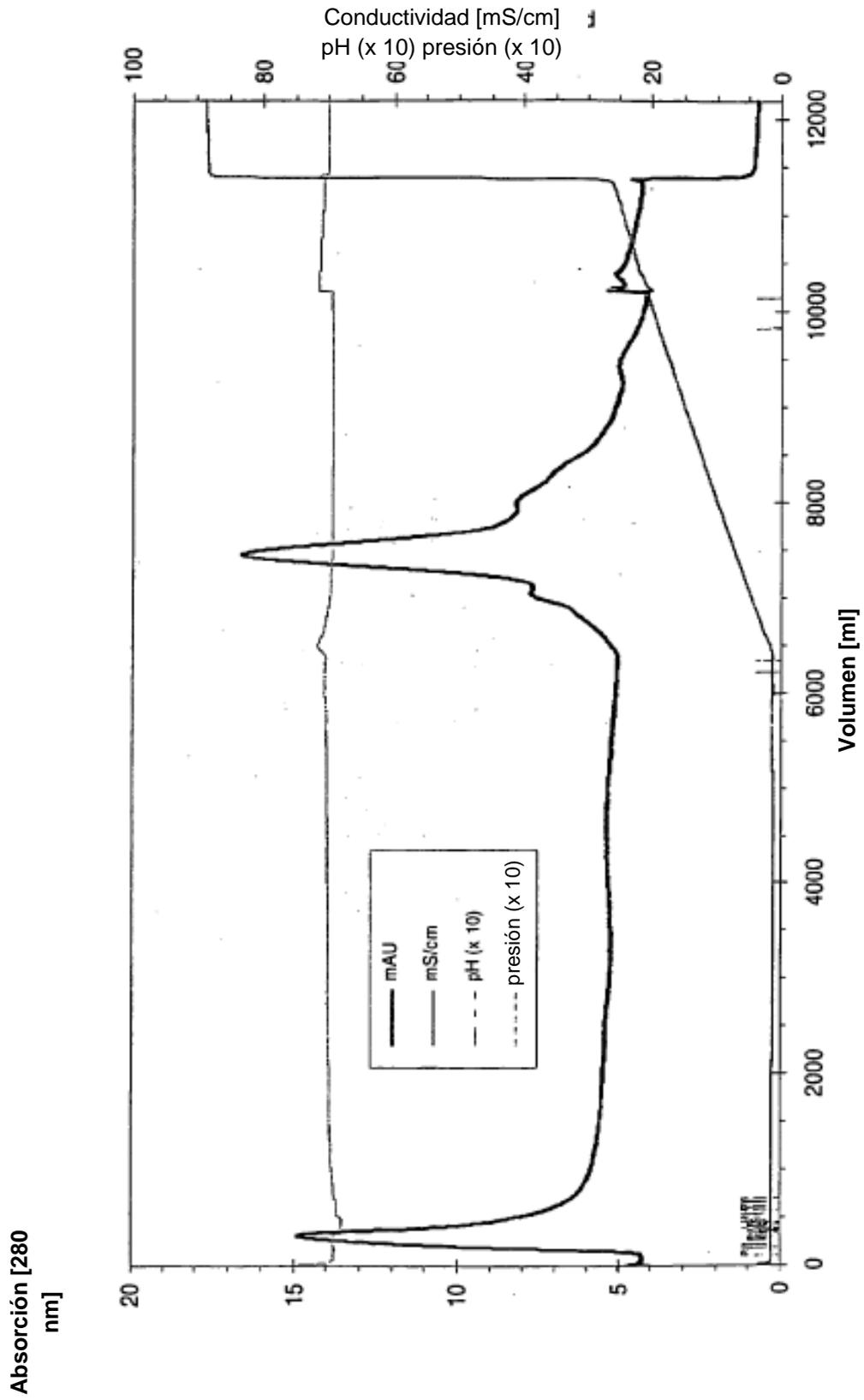
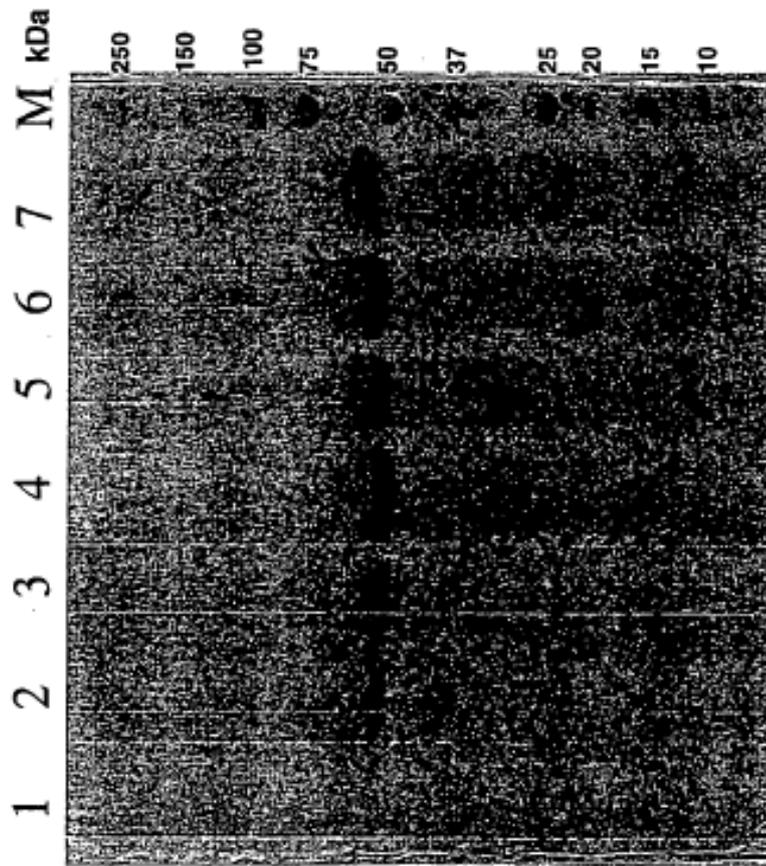


Figura 3



**Figura 4**