

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 321**

51 Int. Cl.:

C07K 14/53 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C12N 15/27 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/KR2011/008046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12057529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11836621 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2632944**

54 Título: **Método para purificar factor estimulador de colonias de granulocitos humanos a partir de E. coli recombinante**

30 Prioridad:

29.10.2010 KR 20100106994

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

02.11.2017

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheungno Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, SUNG CHUL;
KIM, JIN KI;
OH, YOUNG HAK y
LEE, JONG SOO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 321 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para purificar factor estimulador de colonias de granulocitos humanos a partir de E. coli recombinante

La presente invención se refiere a un método para purificar factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) a partir de una E. coli recombinante. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para purificar factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) a partir de E. coli recombinante con alta pureza y rendimiento, que comprende las etapas de (a) cultivar una E. coli recombinante que expresa hG-CSF para obtener un sedimento celular por centrifugación; (b) separar un sobrenadante que contiene hG-CSF del sedimento celular obtenido en la etapa (a); (c) tratar el sobrenadante obtenido en la etapa (b) con un ácido para separar el producto precipitado resultante por filtración; (d) aplicar un producto filtrado obtenido en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico; (e) aplicar un eluato obtenido en la etapa (d) a cromatografía de interacción hidrófoba; y (f) aplicar un eluato obtenido en la etapa (e) a cromatografía de intercambio aniónico.

Técnica anterior

Los factores estimuladores de colonias (CSF, por sus siglas en inglés) son producidos por células T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, y estas células están ampliamente distribuidas por todo el organismo. Los CSF conocidos incluyen GM-CSF, M-CSF y G-CSF. Entre ellos, el GM-CSF es un factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, y actúa sobre células madre de granulocitos o macrófagos para inducir su proliferación y diferenciación, estimulando así la formación de colonias de granulocitos o macrófagos. El M-CSF (CSF de macrófagos) es un factor estimulador de colonias de macrófagos, y funciona principalmente para estimular la formación de colonias de macrófagos. El G-CSF (CSF de granulocitos) es un factor estimulador de colonias de granulocitos, y estimula la formación de colonias de granulocitos e induce la diferenciación final.

Convencionalmente, para aislar y purificar el G-CSF, se cultivan células y se aíslan las proteínas G-CSF del sobrenadante de cultivo. Sin embargo, este método tiene el problema del bajo rendimiento de G-CSF, y por lo tanto no es adecuado para la producción en masa. Además, Chugai Pharmaceuticals Co., Ltd. (Japón) ha desarrollado un método para producir hG-CSF glicosilado en una célula de mamífero empleando un ADN genómico o ADNc que incluye un polinucleótido que codifica hG-CSF (Patentes Coreanas Núm. 47178, 53723 y 57582). Sin embargo, se sabe que la cadena de azúcar de hG-CSF glicosilado no es necesaria para la actividad de hG-CSF y la producción de hG-CSF glicosilado que emplea células de mamífero requiere materiales e instalaciones caras y, por lo tanto, tal procedimiento no es económicamente factible.

Se han realizado intentos para producir hG-CSF no glicosilado empleando una célula procariótica. En estos estudios, se producen hG-CSF que tienen un residuo de metionina unido al extremo N del mismo debido al codón de iniciación ATG, pero esta forma es diferente de la forma nativa. Además, el hG-CSF producido en un microorganismo puede estar contaminado con impurezas derivadas de células anfitrionas o materiales de cultivo, y se requiere un complicado proceso de purificación para la aplicación a un medicamento de alta pureza. Además, cuando se utiliza E. coli como célula anfitriona, la mayor parte de los hG-CSF se depositan en las células como cuerpos de inclusión insolubles, y se deben convertir en una forma activa a través de un proceso de replegamiento, con una pérdida significativa de rendimiento. Durante el proceso, se inducen una reducción parcial, una formación de disulfuro intramolecular o una formación de disulfuro errónea, y por lo tanto se necesita un procedimiento engorroso para eliminarlos y se produce una pérdida de potencia. Un residuo de cisteína no participa en la formación del enlace disulfuro, y por lo tanto existe en forma libre, dando como resultado la pérdida adicional de potencia y la reducción de la estabilidad en una solución de proteína.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un método para producir hG-CSF en masa que no tengan residuos de metionina en su extremo N y, por tanto, sean idénticos a la forma nativa aunque se utilicen microorganismos.

Con el fin de resolver los problemas, los autores de la presente invención han informado previamente de que se prepara un nuevo péptido señal secretor con una tasa de expresión elevada modificando el péptido señal conocido de la enterotoxina II termoestable de E. coli (Patente Coreana Núm. 316347) y se utiliza para producir hG-CSF nativo. Adicionalmente, los autores de la presente invención han preparado un vector de expresión que incluye un gen recombinante que se prepara uniendo el gen hG-CSF, en lugar del gen de la enterotoxina, junto al péptido señal modificado de enterotoxina II termoestable de E. coli, y han transformado E. coli con el vector de expresión, expresando de este modo hG-CSF biológicamente activos en el periplasma al emplear un sistema secretor microbiano (Patente Coreana Núm. 356140).

Mediante el uso del sistema microbiano de secreción de una proteína al periplasma, los hG-CSF nativos que no tienen residuo de metionina en el extremo N-terminal se pueden obtener en una forma soluble. Adicionalmente, las proteínas periplásmicas son normalmente menos de 10% de la proteína celular total y, por tanto, se requiere una purificación menos extensa de la proteína recombinante que para las proteínas situadas en el citoplasma. Además, no se necesita un procedimiento de desorganización celular y se puede minimizar la contaminación con sacáridos y ácidos nucleicos presentes en el citoplasma. Sin embargo, debido al bajo nivel de expresión en la producción periplásmica, su industrialización es difícil. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un método

eficaz para purificar proteínas expresadas con alto rendimiento y pureza.

El documento EP 1 837 346 A describe la purificación de hG-CSF recombinante producido en *E. coli* mediante un método que implica filtración en gel, filtración de flujo tangencial, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y una etapa de cromatografía de filtración en gel.

- 5 El documento US 2008/0260684 describe un método para purificar hG-CSF recombinante producido en *E. coli* y solubilizado a partir de cuerpos de inclusión. Los métodos de purificación implican al menos una etapa cromatográfica de intercambio catiónico y al menos una etapa cromatográfica de interacción hidrófoba, opcionalmente con una etapa cromatográfica de intercambio catiónico adicional.

Descripción de la invención

10 Problema técnico

En consecuencia, los autores de la presente invención se han esforzado por abordar los problemas de la técnica anterior. Como resultado, encontraron que los factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos nativos se pueden producir en masa con alta pureza mediante el cultivo de *E. coli* recombinante para obtener proteínas secretoras y luego aplicar las proteínas a la precipitación ácida → cromatografía de intercambio catiónico →
 15 cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio aniónico en este orden, completando así la presente invención.

Solución al problema

La presente invención proporciona un método para purificar factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) de una *E. coli* recombinante con pureza y rendimiento elevados, que comprende las etapas de:

- 20 (a) cultivar *E. coli* recombinante que expresa hG-CSF para obtener un sedimento celular por centrifugación;
 (b) separar un sobrenadante que contiene hG-CSF del sedimento celular obtenido en la etapa (a);
 (c) tratar el sobrenadante obtenido en la etapa (b) con un ácido para separar el producto precipitado resultante por filtración;
 (d) aplicar un producto filtrado obtenido en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico;
 25 (e) aplicar un eluato obtenido en la etapa (d) a cromatografía de interacción hidrófoba; y
 (f) aplicar un eluato obtenido en la etapa (e) a cromatografía de intercambio aniónico.

Efectos ventajosos de la invención

- De acuerdo con el método de la presente invención, el factor estimulador de colonias de granulocitos humanos, idéntico a la forma nativa expresada en el cuerpo humano, se puede purificar fácilmente con rendimiento y pureza
 30 elevados sin un procedimiento de activación adicional. En particular, de acuerdo con el método de la presente invención, las variantes de hG-CSF expresadas en *E. coli* se eliminan eficazmente para obtener hG-CSF fisiológicamente activos con alta pureza.

Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 muestra los resultados de la SDS-PAGE de cada solución obtenida de las etapas de extracción osmótica, precipitación con ácido, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba de hG-CSF que se purifican a partir del periplasma de *E. coli* recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención, en el que

Calle 1: Patrón

Calle 2: Sobrenadante de la centrifugación primaria de la etapa (b)

- 40 Calle 3: Sobrenadante de la centrifugación secundaria de la etapa (b)

Calle 4: Sobrenadante obtenido por precipitación con ácido de la etapa (c)

Calle 5: Producto filtrado obtenido por filtración de la etapa (c)

Calle 6: Flujo en columna de la columna de SP-sepharose de la etapa (d)

Calle 7: Flujo del eluato 1 de la columna de la columna de SP-sepharose de la etapa (d)

- 45 Calle 8: Flujo del eluato 2 de la columna de la columna de SP-sepharose de la etapa (d)

Calle 9: Flujo del flujo 2 de la columna de la columna de butil-sefarosa de la etapa (e)

Calle 10: Flujo del eluato 2 de la columna de la columna de butil-sefarosa de la etapa (e);

FIG. 2 muestra el resultado de SDS-PAGE del eluato de columna que se obtiene por cromatografía de intercambio aniónico del método de purificación de la presente invención;

5 FIG. 3 muestra el resultado de la cromatografía de alta presión en fase inversa del eluato de columna que se obtiene por cromatografía de intercambio aniónico del método de purificación de la presente invención; y

FIG. 4 muestra el resultado de la cromatografía de alta presión de exclusión por tamaño del eluato de la columna que se obtiene mediante cromatografía de intercambio aniónico del método de purificación de la presente invención.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

10 La presente invención proporciona un método para purificar simplemente una gran cantidad de factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) con alta pureza a partir de una E. coli recombinante sin un procedimiento de activación adicional.

Específicamente, el método de purificación de acuerdo con la presente invención puede incluir las etapas de:

- (a) cultivar una E. coli recombinante que expresa hG-CSF para obtener un sedimento celular por centrifugación;
- 15 (b) separar un sobrenadante que contiene hG-CSF a partir del sedimento celular obtenido en la etapa (a);
- (c) tratar el sobrenadante obtenido en la etapa (b) con un ácido para separar el producto precipitado resultante por filtración;
- (d) aplicar un producto filtrado obtenido en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico;
- (e) aplicar un eluato obtenido en la etapa (d) a cromatografía de interacción hidrófoba; y
- 20 (f) aplicar un eluato obtenido en la etapa (e) a cromatografía de intercambio aniónico.

El método de purificación de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque después de la precipitación con ácido, los hG-CSF obtenidos a partir de E. coli recombinante se aplican a una serie de etapas de cromatografía (cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico), aislando de ese modo hG-CSF altamente puros adecuados para uso farmacéutico.

25 A continuación, se describirá en detalle cada etapa del método de purificación de acuerdo con la presente invención.

La etapa (a) es una etapa de cultivo de una E. coli recombinante que expresa hG-CSF para obtener un sedimento celular por centrifugación. La E. coli recombinante utilizada en esta etapa es cualquiera que exprese hG-CSF, preferiblemente cualquiera que exprese hG-CSF en el periplasma, sin limitación. Más preferiblemente, los hG-CSF de la presente invención son hG-CSF solubles expresados en E. coli. En la presente invención, la E. coli recombinante que expresa hG-CSF en el periplasma es una E. coli recombinante que se transforma con un vector de expresión que incluye un gen de fusión que codifica una proteína de fusión de la secuencia señal secretora y hG-CSF. Los ejemplos representativos de la E. coli recombinante incluyen HM10310, HM10311 (KCCM-10154), HM10409, HM10410 (KCCM-10151), HM10411 (KCCM-10152), HM10413, HM10414, HM10415, HM10510 (KCCM-10153), HM10511 y HM10512 descritos en la Patente Coreana Núm. 356140 de los autores de la presente invención, en los que la E. coli recombinante es transformada con un vector de expresión preparado por fusión de un péptido señal modificado de enterotoxina II termorresistente y hG-CSF de E. coli, pero no se limitan a ella.

Con el fin de expresar hG-CSF en el periplasma de la E. coli recombinante, la E. coli recombinante se puede cultivar mediante cultivo de alimentación discontinua en un fermentador que contiene un medio LB con un suplemento de 1 a 300 g/L de glucosa como fuente de carbono, de 2 a 15 g/L de KH_2PO_4 , de 0,5 a 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, de 2 a 10 g/L de NaCl y de 0,5 a 10 g/L de MgCl_2 como minerales, una variedad de oligoelementos, extracto de levadura y triptona. Esta composición de medio es adecuada para un cultivo de alta densidad de E. coli recombinante y una elevada expresión de hG-CSF en el periplasma de E. coli. En una realización preferida de la presente invención, se utilizó la E. coli recombinante HM10411 (KCCM-10152) para realizar un experimento, y como resultado, se encontró que la composición del medio aumentaba enormemente la densidad celular de la E. coli recombinante, el nivel de expresión de hG-CSF en E. coli y la tasa de secreción de hG-CSF al periplasma. El caldo de cultivo obtenido a partir de E. coli recombinante se centrifuga para obtener un sedimento celular.

La etapa (b) es una etapa de separación de un sobrenadante que contiene hG-CSF a partir del sedimento celular obtenido en la etapa (a). En una realización preferida de la presente invención, cuando se utiliza la E. coli recombinante que expresa hG-CSF en el periplasma, las proteínas periplásmicas que incluyen hG-CSF se pueden separar de las células mediante extracción osmótica. A este respecto, la etapa (b) puede incluir las etapas de añadir una solución tampón que contiene sacarosa al sedimento celular para obtener un sedimento celular por

centrifugación; y añadir agua destilada al sedimento de células para obtener un sobrenadante que contiene proteínas periplásmicas por centrifugación. En esta etapa, las proteínas periplásmicas que incluyen los hG-CSF se extraen por presión osmótica. En primer lugar, cuando el sedimento de células se trata con la solución tampón que contiene sacarosa, por ejemplo, una solución tampón que contiene sacarosa del 10% al 30%, las células se encogen. En ese caso, cuando el sedimento celular se trata nuevamente con agua destilada, las células encogidas se expanden y la pared celular se distiende. Por lo tanto, la pared celular no se desorganiza, pero las proteínas periplásmicas que incluyen los hG-CSF presentes entre la membrana celular y la pared celular se extraen a través de la pared celular distendida. En la extracción osmótica de la etapa (b), se pueden utilizar sacarosa, glucosa, MgCl₂, cloruro sódico o similares. Preferiblemente, se utiliza la solución tampón de sacarosa. El extracto se centrifugó para obtener un sobrenadante que contenía la proteína periplásmica.

La etapa (c) es una etapa de precipitación con ácido de tratar el sobrenadante que contiene hG-CSF obtenido en la etapa (b) con un ácido para separar el producto precipitado resultante por filtración. En una realización preferida de la presente invención, cuando se utiliza la E. coli recombinante que expresa los hG-CSF en el periplasma, se puede separar un sobrenadante que contiene hG-CSF soluble del sobrenadante incluyendo proteínas periplásmicas por precipitación con ácido. Específicamente, cuando el sobrenadante obtenido en la etapa (b) se trata con un ácido para ajustar el pH del sobrenadante de 5,0 a 5,8, preferiblemente de 5,3 a 5,5, precipita la materia insoluble que incluye proteínas periplásmicas en el sobrenadante y este producto precipitado se separa por filtración con el fin de obtener un sobrenadante que contiene hG-CSF soluble. Los ejemplos del ácido adecuado para la precipitación con ácido de la etapa (c) incluyen ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico o similares, y preferiblemente ácido acético. La filtración se puede realizar utilizando un filtro apropiado, y preferiblemente un filtro de 0,45 a 3 µm. Puesto que en la presente invención se utiliza E. coli recombinante que secreta hG-CSF al periplasma, no hay necesidad de desorganizar E. coli, y la fracción del periplasma se puede obtener fácilmente a partir del caldo de cultivo para extraer los hG-CSF.

La etapa (d) es una etapa de aplicación de un producto filtrado que contiene hG-CSF soluble obtenido en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico. A través de esta etapa, se puede eliminar una gran cantidad de impurezas derivadas de células anfitrionas o materiales de cultivo para mejorar la eficacia de purificación.

Un grupo funcional de la columna de la cromatografía de intercambio catiónico utilizada en la presente invención puede incluir cationes débiles tales como carboximetil- (CM-) y carboxi- (C-) y cationes fuertes tales como sulfo- (S-), sulfometil- (SM-), sulfoetil- (SE-), sulfopropil- (SP-) y fosfo- (P-). Se puede utilizar una variedad de resinas de columna, incluyendo sefarosa, sefadex, agarosa, sefacel, poliestireno, poliacrilato, celulosa y Toyopearl. En una realización preferida de la presente invención, el método de purificación se puede llevar a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna de SP-sefarosa.

En la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo utilizando una solución tampón que contiene ácido acético como eluyente dentro de un pH que varía de pH 4,0 a 6,0, preferiblemente de pH 5,0 a 6,0 a una concentración de sal de 500 mM o menos, preferiblemente de 200 a 500 mM. La columna de intercambio catiónico que se vaya a utilizar se puede equilibrar con una solución tampón antes de cargar el eluato. El equilibrado de la columna de intercambio catiónico se puede realizar utilizando una solución tampón acuosa de pH 5,0 a 6,0, que se selecciona apropiadamente de acuerdo con las condiciones. En una realización preferida de la presente invención, la columna de intercambio de cationes se equilibra con una solución tampón que contiene acetato de sodio 10 mM (pH 5,4) con antelación. Después de que el producto filtrado que contiene hG-CSF sea cargado y adsorbido sobre la columna de intercambio catiónico equilibrada, la columna se lava con la solución tampón de equilibrado para eliminar las proteínas e impurezas que no son adsorbidas sobre la columna. Posteriormente, se aplica una solución tampón de elución preparada por adición de cloruro sódico a la solución tampón de equilibrado a la columna de intercambio catiónico, con el fin de hacer eluir los hG-CSF que están adsorbidos sobre la columna. A este respecto, se aplican preferiblemente de 3 a 7 volúmenes de columna de la solución tampón de elución. En una realización preferida de la presente invención, se aplican a la columna 4 a 6 volúmenes de columna de una solución tampón (pH 5,2 a 5,6) que contiene acetato sódico de 5 a 20 mM y NaCl de 300 a 400 mM para hacer eluir los hG-CSF que se adsorben sobre la columna.

En la etapa anterior, los péptidos derivados de células anfitrionas o los componentes en el medio de cultivo se hacen pasar a través de la columna o se eliminan durante una etapa de lavado, con el fin de eliminar eficazmente una gran cantidad de impurezas.

La etapa (e) es una etapa de (e) aplicar un eluato obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (d) a cromatografía de interacción hidrófoba, y una etapa de mejorar la pureza eliminando adicionalmente las impurezas que están incluidas en el eluato obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa anterior.

La cromatografía de interacción hidrófoba utilizada en la presente invención se puede realizar sobre geles con ligandos hidrófobos, adecuadamente alifáticos o aromáticos, libres de carga, unidos a diversas matrices comercialmente disponibles. Los ligandos se pueden acoplar a la matriz mediante técnicas de acoplamiento convencionales que proporcionan ligandos libres de carga. Los ejemplos de tal técnica incluyen un método de utilización del acoplamiento glicidil-éter; un método de activación de una matriz de agarosa con

glicidoxipropiltrimetoxi-silano en agua y a continuación inmovilización del ligando en alcohol; un método de activación de una matriz de agarosa con bis-epóxido, tal como 1,4-butanodiol diglicidil éter y a continuación acoplamiento a ligandos tales como aminoalquilo o alquilmercaptano; un método de activación de 1,1-carbonildiimidazol; y un método de activación de divinilsulfona. Los geles resultantes de las técnicas descritas anteriormente están libres de carga dentro de todo el intervalo de pH. Los ejemplos del ligando alifático pueden incluir alquilos lineales tales como propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo, alquilos ramificados tales como iso- o neoalquilo y oligoetilenglicol. El ligando aromático es preferiblemente fenilo. La matriz se puede seleccionar adecuadamente a partir de diversas matrices fuertemente hidrófilas, por ejemplo, una matriz de agarosa tal como sefarosa, una matriz polimérica orgánica tal como TSK-GEL, y una matriz polimérica orgánica altamente porosa. La matriz preferida es una matriz de agarosa. Una matriz de agarosa adecuada es sefarosa (Amersham Biosciences), Bio-Gel A (Laboratorios Bio-Rad), Minileak (Kem-En-Tec Diagnostics A/S) o similares. En una realización preferida de la presente invención, la cromatografía de interacción hidrófoba de la presente invención se lleva a cabo en un gel de butil-sefarosa.

En la presente invención, la cromatografía de interacción hidrófoba se realiza utilizando una solución tampón dentro del pH que varía de pH 7,0 a 8,5, preferiblemente de pH 7,5 a 8,0, con una concentración de sal de 100 mM o menos, preferiblemente de 0 a 50 mM como eluyente. La columna de interacción hidrófoba que se va a utilizar se puede equilibrar con una solución tampón antes de cargar el eluato. El equilibrado de la columna de interacción hidrófoba se puede realizar utilizando una solución tampón acuosa de pH 6,8 a 8,5, que se selecciona apropiadamente de acuerdo con las condiciones. En una realización preferida de la presente invención, la columna de interacción hidrófoba se equilibra con una solución tampón (pH 7,5) que contiene sulfato de amonio 300 mM y Tris 10 mM por adelantado. Después de cargar el eluato obtenido en la etapa anterior sobre la columna de interacción hidrófoba equilibrada para adsorber hG-CSF, la columna se lava con la solución tampón de equilibrado para eliminar las proteínas y las impurezas que no están adsorbidas sobre la columna. Posteriormente, se aplica a la columna de interacción hidrófoba una solución tampón de elución preparada eliminando sulfato de amonio de la solución tampón de equilibrado, con el fin de eluir los hG-CSF que están adsorbidos sobre la columna. A este respecto, se aplican preferentemente de 1 a 4 volúmenes de columna de la solución tampón de elución. En una realización preferida de la presente invención, se aplican a la columna de 1,2 a 2,5 volúmenes de columna de una solución tampón (pH 7,0 a 8,0) que contiene Tris 5 a 20 mM para hacer eluir los hG-CSF que están adsorbidos sobre la columna.

En general, antes de realizar la cromatografía de interacción hidrófoba, se puede añadir una sal a una fracción con el fin de aumentar la conductividad de la fracción. Después, la elución se realiza a partir de la matriz utilizando un tampón de baja fuerza iónica. Preferiblemente, en la cromatografía de interacción hidrófoba de la presente invención, se añade sulfato de amonio al eluato obtenido en la etapa (d), para aumentar su conductividad, similar a la de la solución tampón de equilibrado. A continuación, el eluato se carga en la columna de interacción hidrófoba equilibrada. En la cromatografía de interacción hidrófoba de la presente invención, el eluato obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa anterior se puede cargar también sin pretratamiento y los hG-CSF se adsorben sobre la columna. Las impurezas se hacen pasar a través de la columna o se eliminan durante una etapa de lavado, con el fin de mejorar adicionalmente la eficacia de purificación.

La etapa (f) es una etapa de aplicación de un eluato obtenido de la cromatografía de interacción hidrófoba en la etapa (e) a cromatografía de intercambio aniónico, y una etapa de eliminación completa de las impurezas que se incluyen en el eluato obtenido de la cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa anterior.

La cromatografía de intercambio aniónico de la presente invención se lleva a cabo típicamente utilizando una matriz que contiene un soporte de partículas insolubles derivatizado con un grupo amina terciaria o cuaternaria (p. ej., dietilaminoetilo, trietilaminoetilo, bencil-dietilaminoetilo). Un soporte adecuado incluye esferas de celulosa, agarosa, dextrano y poliestireno. Preferiblemente, el soporte se derivatiza con el grupo trietilaminoetilo. Los ejemplos de la matriz de intercambio aniónico adecuada incluyen Q-sepharose (Amersham Biosciences), Macro-Prep Q (Bio-Rad Laboratories), Q-HyperD (BioSeptra, Inc.), Fractogel EMD-TMAE 650 (Merck) o similares. En una realización preferida de la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico de la presente invención se lleva a cabo utilizando una columna Q-sepharose.

En la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando una solución tampón dentro de un pH que varía de pH 6,8 a 8,5, preferiblemente pH 7,0 a 8,0 con una concentración de sal de 300 mM o menos, preferiblemente de 100 a 250 mM como eluyente. La columna de intercambio aniónico que se va a utilizar se puede equilibrar con una solución tampón antes de cargar el eluato. El equilibrado de la columna de intercambio aniónico se puede realizar utilizando una solución tampón acuosa de pH 6,8 a 8,5, que se selecciona apropiadamente de acuerdo con las condiciones. En una realización preferida de la presente invención, la columna de intercambio aniónico se equilibra con una solución tampón (pH 7,5) que contiene Tris 10 mM y urea 100 mM con antelación. Después de cargar el eluato obtenido en la etapa previa sobre la columna de intercambio aniónico equilibrada para adsorber los hG-CSF a la misma, la columna se lava con la solución tampón de equilibrado para eliminar las proteínas e impurezas que no están adsorbidas sobre la columna. Posteriormente, se aplica una solución tampón de elución preparada por adición de cloruro de sodio a la solución tampón de equilibrado a la columna de intercambio aniónico, para hacer eluir los hG-CSF que están adsorbidos sobre la columna. A este respecto, se aplican preferiblemente 1,5 a 5 volúmenes de columna de la solución tampón de elución. En una realización preferida de la presente invención, se aplican a la columna de 2 a 4 volúmenes de columna de una

solución tampón (pH 7,0 a 8,0) que contiene Tris 5 a 20 mM, urea 50 a 200 mM y NaCl 150 a 250 mM para hacer eluir los hG-CSF que están adsorbidos sobre la columna.

5 Como se ha descrito anteriormente, los hG-CSF se purifican mediante la precipitación con ácido y una serie de cromatografías de acuerdo con la presente invención, y los hG-CSF purificados se someten a cromatografía de alta
 10 resolución de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaño. Como resultado, se obtuvo hG-CSF con una pureza de 99% o más con un alto rendimiento. Específicamente, el resultado del análisis de la secuencia N-terminal mostró que el hG-CSF purificado de acuerdo con el método de la presente invención tiene una secuencia idéntica a la del hG-CSF nativo, y el hG-CSF purificado contiene las proteínas derivadas de células anfitrionas de 100 ng/mg o menos, los ADN derivados de células anfitrionas de 100 pg/mg o menos y enterotoxina de 10 UE/UI de hG-CSF o menos, y muestra una excelente actividad fisiológica. Estos resultados sugieren que, cuando los hG-CSF secretados al periplasma de *E. coli* recombinante se purifican de acuerdo con el método de purificación de la presente invención, se pueden obtener hG-CSF con alta actividad fisiológica y pureza con un alto rendimiento, y también se pueden superar la pérdida de potencia y la selección limitada de columnas.

15 Además, el método de purificación de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque los hG-CSF se pueden purificar con un rendimiento y pureza elevados a partir de una gran cantidad de caldo de cultivo de *E. coli* recombinante. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "una gran cantidad de caldo de cultivo" significa un caldo de cultivo obtenido cultivando la *E. coli* recombinante a un nivel de fermentación en un medio de 50 L o más, preferiblemente 80 L o más y más preferiblemente 100 L o más. En una realización preferida de la presente invención, la *E. coli* recombinante se inocula en 1 L de medio esterilizado para obtener un caldo de cultivo de siembra primario y este caldo de cultivo de siembra se inocula en 14 L de medio esterilizado para obtener un caldo de cultivo de siembra secundario. Finalmente, el caldo de cultivo de siembra secundario se inocula en 120 L de medio esterilizado, seguido de fermentación. Se utilizan medios adicionales para llevar a cabo el cultivo de alimentación discontinua, obteniendo de este modo 180 L de caldo de cultivo de *E. coli* recombinante. Cuando se aíslan los hG-CSF y se purifican a partir de una gran cantidad de caldo de cultivo de *E. coli* recombinante de acuerdo con el método descrito en la Patente Coreana Núm. 356140, sólo se producen 70 mg de hG-CSF por 1 L. Es decir, el método convencional tiene una limitación en el sentido de que es difícil producir la proteína deseada con pureza y rendimiento elevados. Sin embargo, de acuerdo con el método de purificación de la presente invención, aunque el volumen de caldo de cultivo se aumente a escala hasta 100 L o más, se pueden obtener hG-CSF con una pureza de 99% o más con un alto rendimiento de 110 mg o más por 1 L a través de la precipitación con ácido y una serie de cromatografías. Por lo tanto, el método de purificación de acuerdo con la presente invención se puede aplicar eficazmente para el aislamiento y purificación de los hG-CSF a partir de una gran cantidad de caldo de cultivo de *E. coli* recombinante. Por lo tanto, se puede lograr una mayor productividad mediante su aplicación industrial.

Modo de la invención

35 A continuación, se describirá la presente invención con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son sólo para propósitos ilustrativos, y no se pretende que la invención esté limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo de referencia 1 Cultivo de *E. coli* recombinante que expresa hG-CSF en periplasma

40 Se inoculó *E. coli* HM10411 (KCCM-10152, Patente de Corea Núm. 356140) transformada con un vector de expresión T017SG que tenía una fusión de un péptido señal modificado de enterotoxina II termorresistente de *E. coli* y hG-CSF en un recipiente de cultivo de vidrio que contenía 1 L de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) para realizar un cultivo de siembra primario. El medio de cultivo se cultivó a 37°C durante 11 a 13 horas bajo agitación vigorosa y ventilación, y a continuación se inoculó en un recipiente de cultivo que contenía 14 L de medio LB esterilizado para realizar un cultivo de siembra secundario durante 2 a 3 horas. El caldo de cultivo obtenido se utilizó como siembra para la fermentación y se inoculó en 120 L de medio esterilizado con un suplemento de 1,4 g/L de glucosa como fuente de carbono, 10 g/L de KH_2PO_4 , 2,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5 g/L de NaCl y 1,2 g/L de MgCl_2 como minerales, una variedad de oligoelementos, extracto de levadura y triptona. Durante la fermentación, se añadieron glucosa y extracto de levadura adicionales para llevar a cabo un cultivo de alimentación discontinua durante 25 horas o más, y el cultivo se completó para proporcionar 180 L de caldo de cultivo. Después de la finalización de la fermentación, el caldo fermentado se centrifugó a 7.000 rpm y el sedimento celular obtenido se almacenó a -70°C.

Ejemplo 1: Purificación de hG-CSF a partir de caldo de cultivo de *E. coli* recombinante

<1-1> Extracción osmótica de proteínas periplásmicas

55 El sedimento de *E. coli* obtenido en el Ejemplo de Referencia se suspendió en 170 L de solución tampón de sacarosa (sacarosa al 20%, EDTA 1 mM, Tris 30 mM, pH 7,5) y se agitó durante 90 minutos, seguido de centrifugación primaria a 7.000 rpm, y de este modo se separó un sedimento. Se añadieron 170 L de agua destilada a 4°C al sedimento separado y se realizó una centrifugación secundaria a 7.000 rpm para eliminar un sedimento y aislar un sobrenadante que contenía proteínas periplásmicas. Durante este procedimiento, se extrajeron las proteínas presentes en el periplasma de *E. coli*. Los sobrenadantes obtenidos en los procedimientos de

centrifugación primaria y secundaria se analizaron mediante SDS-PAGE (Calles 2 y 3 de la FIG. 1).

<1-2> Precipitación con ácido

5 Se añadió ácido acético al 1% al sobrenadante que contenía proteína periplásmica obtenido en el Ejemplo <1-1> para ajustar el pH de 5,6 a 5,7. En este momento, los materiales insolubles incluidos en el sobrenadante se hicieron precipitar mediante tratamiento con ácido, y se realizó una filtración para eliminarlos, con el fin de obtener un sobrenadante que contenía hG-CSF. El sobrenadante obtenido por tratamiento con ácido y el producto filtrado obtenido por filtración se analizaron mediante SDS-PAGE (Calles 4 y 5 de la FIG. 1).

<1-3> Cromatografía de intercambio catiónico

10 La cromatografía de intercambio catiónico del producto filtrado obtenido en el Ejemplo <1-2> se realizó utilizando una columna de SP-sepharose como sigue. El producto filtrado se cargó y adsorbió sobre la columna de SP-sepharose equilibrada con una solución tampón 1 (acetato de sodio 10 mM, pH 5,4) a una velocidad de flujo de 40 cm/h, y después las proteínas que no habían sido adsorbidas sobre la columna se eliminaron por lavado con una solución tampón igual. Posteriormente, se aplican 5 volúmenes de columna de la solución tampón 1 (acetato de sodio 10 mM, pH 5,4) que contenía cloruro sódico 300 mM a la columna para hacer eluir los hG-CSF de la columna. 15 El flujo y el eluato obtenidos mediante la cromatografía de intercambio catiónico se analizaron mediante SDS-PAGE (Calles 6 a 8 de la FIG. 1).

<1-4> Cromatografía de interacción hidrófoba

20 El eluato obtenido en el Ejemplo <1-3> se diluyó por adición de sulfato amónico hasta una concentración final de 300 mM, y se realizó la cromatografía de interacción hidrófoba utilizando una columna de butil-sefarosa como sigue. El eluato se cargó y se adsorbió sobre la columna de butil-sefarosa equilibrada con una solución tampón 2 (sulfato de amonio 300 mM, Tris 10 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 80 cm/h, y a continuación las proteínas que no eran adsorbidas sobre el columna se eliminaron por lavado con una solución tampón igual. Posteriormente, se aplicaron a la columna 1,5 volúmenes de columna de la solución tampón 2 (Tris 10 mM, pH 7,5), excluyendo el sulfato de amonio, para hacer eluir los hG-CSF de la columna. El flujo y el eluato obtenidos mediante la cromatografía de 25 interacción hidrófoba se analizaron por SDS-PAGE (Calles 9 a 10 de la FIG. 1).

<1-5> Cromatografía de intercambio aniónico

30 El eluato obtenido en el Ejemplo <1-4> se diluyó por adición de urea hasta una concentración final de 50 mM, y se realizó una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Q-sepharose como sigue. El eluato se cargó y adsorbió sobre la columna Q-sepharose equilibrada con una solución tampón 3 (Tris 10 mM, pH 7,5, urea 100 mM) a una velocidad de flujo de 60 cm/h, y a continuación las proteínas que no eran adsorbidas sobre la columna se eliminaron por lavado con una solución tampón igual. Posteriormente, se aplicaron a la columna 3 volúmenes de columna de la solución tampón 3 (Tris 10 mM, pH 7,5, urea 100 mM) que contenía cloruro de sodio 250 mM para hacer eluir los hG-CSF de la columna. El eluato obtenido por cromatografía de intercambio aniónico se analizó mediante SDS-PAGE (Calle 2 de la FIG. 2).

35 Con el fin de examinar la pureza de los hG-CSF purificados a partir de la E. coli recombinante por los procedimientos de los Ejemplos <1-1> a <1-5>, se llevaron a cabo la SDS-PAGE, el análisis de la secuencia N-terminal, la cromatografía de alta presión de fase inversa, y la cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo Experimental 1: Análisis SDS-PAGE

40 En primer lugar, se analizaron el sobrenadante, el flujo de columna y el eluato de columna obtenidos en cada procedimiento de los Ejemplos <1-1> a <1-5>, y un G-CSF patrón (NIBSC, Código Núm. 88/502) mediante SDS-PAGE de acuerdo con un método típico. Los resultados de la SDS-PAGE se muestran en las FIGS. 1 y 2. En la FIG. 1, la Calle 1 es un G-CSF patrón, la Calle 2 es el sobrenadante de la centrifugación primaria obtenido por extracción osmótica del Ejemplo <1-1>, la Calle 3 es el sobrenadante de la centrifugación secundaria obtenido por extracción osmótica del Ejemplo <1-1>, la Calle 4 es el sobrenadante obtenido por tratamiento con ácido en la etapa de 45 precipitación con ácido del Ejemplo <1-2>, la Calle 5 es el producto filtrado obtenido por filtración en la etapa de precipitación ácida del Ejemplo <1-2>, la Calle 6 es el flujo de columna obtenido de la cromatografía en columna de SP-sepharose del Ejemplo <1-3>, las Calles 7 y 8 son el eluato de la columna 1 y 2 obtenido de la cromatografía en columna de SP-sepharose del Ejemplo <1-3>, la Calle 9 es el flujo de columna obtenido de la cromatografía en columna de butil-sefarosa del Ejemplo <1-4>, y la Calle 10 es el eluato de la columna obtenido de la cromatografía 50 en columna de butil-sefarosa del Ejemplo <1-4>. En la FIG. 2, la Calle 1 es un Met-hG-CSF patrón, y la Calle 2 es el eluato de la columna obtenido de la cromatografía en columna de Q-sepharose del Ejemplo <1-5>.

Los resultados del análisis de SDS-PAGE mostraron que los hG-CSF aislados y purificados a partir de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención tienen un peso molecular igual al de la forma nativa.

55 Ejemplo Experimental 2: Análisis de la secuencia N-terminal

Los hG-CSF purificados por los procedimientos de los Ejemplos <1> a <1-5> se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana transferida se tiñó utilizando una solución de Ponceau S y a continuación se analizó la secuencia N-terminal (15 aminoácidos) en el Korea Basic Science Institute (rama de Seúl).

- 5 Como resultado, se encontró que la secuencia N-terminal de hG-CSF aislada y purificada a partir de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención era idéntica a la de la forma nativa y contenía las proteínas derivadas del anfitrión de 100 ng/mg o menos, los ADN derivados del anfitrión de 100 pg/mg o menos y la enterotoxina de 10 UE/UI hG-CSF o menos.

Ejemplo Experimental 3: Cromatografía de alta presión de fase inversa

- 10 El eluato obtenido en el Ejemplo <1-5> se aplicó a una columna de sílice de butilsililo, y después se añadió TFA/agua al 0,1% y TFA/acetronitrilo al 0,1% como fase móvil a la columna para realizar la cromatografía de alta presión de fase inversa. El cromatograma resultante se muestra en la FIG. 3.

- 15 Como se muestra en la FIG. 3, se encontró que los hG-CSF aislados y purificados a partir de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención tenían una pureza muy alta mediante la eliminación eficaz de microvariedades que tenían características similares.

Ejemplo Experimental 4: Cromatografía de alta presión de exclusión por tamaño

- 20 El eluato obtenido en el Ejemplo <1-5> se aplicó a una columna de gel de sílice hidrófila (peso molecular de 20.000 a 200.000), y a continuación se añadieron fosfato de potasio 20 mM (pH 6,0)/cloruro sódico 200 mM como fase móvil a la columna para realizar la cromatografía de alta presión de exclusión por tamaño. El cromatograma resultante se muestra en la FIG. 4.

Como se muestra en la FIG. 4, se encontró que los hG-CSF aislados y purificados a partir de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención tenían una pureza muy alta por eliminación eficaz de péptidos que tenían características similares.

- 25 En los Ejemplos Experimentales 1 a 4, se confirmó que se pueden obtener hG-CSF nativos con una pureza de 99% o más, con un rendimiento de 110 mg por 1 L de caldo de cultivo de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación de la presente invención. Como grupo de comparación, los hG-CSF se purificaron a partir de la E. coli recombinante de acuerdo con el método de purificación descrito en la Patente Coreana Núm. 356140 (resina de intercambio iónico, columna de adsorción y filtración en gel o cromatografía en columna de anticuerpo) y se obtuvieron hG-CSF con una pureza de 99% o más con un rendimiento de 70 mg por 1 L de caldo de cultivo. Este resultado indica que se pueden obtener hG-CSF con una pureza de 99% o más con un rendimiento mejorado de 50% o más por el método de purificación de la presente invención, en comparación con el método descrito en la Patente Coreana Núm. 356140.
- 30

Ejemplo Experimental 5: Ensayo de potencia ex vivo

- 35 Con el fin de examinar la actividad fisiológica de los hG-CSF obtenidos de acuerdo con el método de purificación de la presente invención, los hG-CSF purificados en el Ejemplo <1-5> y un patrón internacional (NIBSC) se sometieron a ensayo de potencia ex vivo en células de médula ósea derivadas de ratones. Específicamente, los fémures se diseccionaron de ratones de 4 a 6 semanas de edad y las células de médula ósea se cosecharon, y a continuación se cultivaron a una densidad adecuada. Los hG-CSF purificados y la muestra patrón internacional se mezclaron con las células de médula ósea cultivadas variando la concentración (100,00, 33,33, 11,11, 3,70, 1,23, 0,41, 0,14, 0,05, 0,02, 0,01 ng/ml) y se cultivaron durante 2 a 3 días. Se añadió [metil-³H]timidina al medio de cultivo, y las células se cultivaron durante 10 a 20 horas más. A continuación, se aislaron las células y se midieron los CPM utilizando un contador beta. Como resultado, se encontró que los hG-CSF aislados y purificados de acuerdo con el método de purificación de la presente invención satisfacían el patrón internacional de 0,6 a 1,4 x 10⁸ UI/mg.
- 40

Aplicabilidad Industrial

- 45 El método de la presente invención puede purificar fácilmente el factor estimulador de colonias de granulocitos humanos, de una manera idéntica a la forma nativa expresada en el organismo humano, con rendimiento y pureza elevados sin un proceso de activación adicional. En particular, de acuerdo con el método de la presente invención, las variantes de hG-CSF expresadas en E. coli se eliminan eficazmente para obtener hG-CSF fisiológicamente activos con una alta pureza.

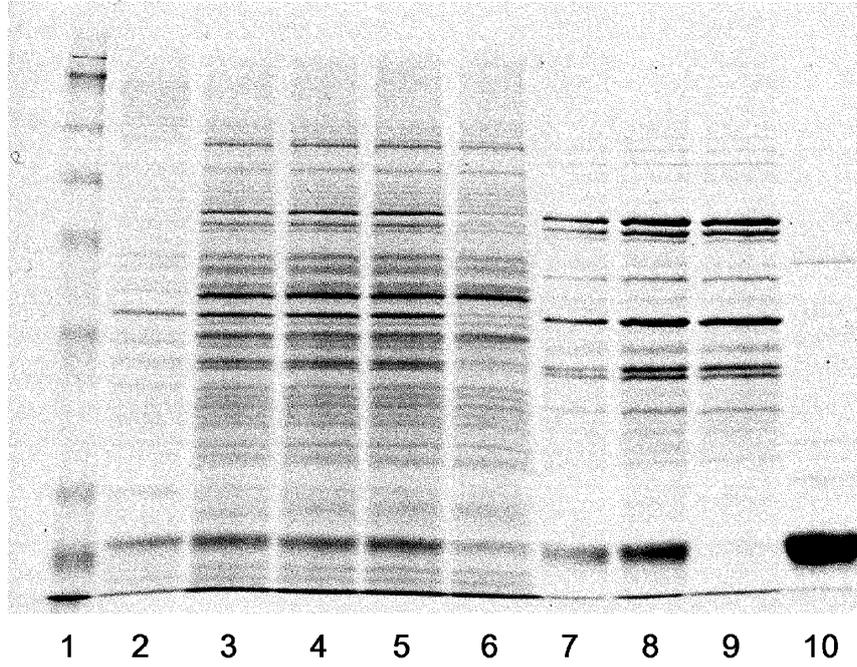
50

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) a partir de una E. coli recombinante con un alto rendimiento, que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar una E. coli recombinante que expresa hG-CSF para obtener un sedimento celular por centrifugación;
 - 5 (b) separar un sobrenadante que contiene hG-CSF del sedimento celular obtenido en la etapa (a);
 - (c) tratar el sobrenadante obtenido en la etapa (b) con un ácido para separar el precipitado resultante por filtración;
 - (d) aplicar un producto filtrado obtenido en la etapa (c) a cromatografía de intercambio catiónico;
 - (e) aplicar un eluato obtenido en la etapa (d) a cromatografía de interacción hidrófoba; y
 - (f) aplicar un eluato obtenido en la etapa (e) a cromatografía de intercambio aniónico.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (a), los hG-CSF se expresan en el periplasma de E. coli recombinante.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la E. coli recombinante es una o más seleccionadas del grupo que consiste en E. coli BL21 (DE3)/pT14SS1SG (HM 10310), E. coli BL21 (DE3)/pT14SS1S17SEG (HM 10311; Núm. de acceso KCCM-10154), E. coli BL21(DE3)/pTO1SG (HM 10409), E. coli BL21(DE3)/pTO1S17SG (HM 10410, Núm. de acceso KCCM-10151), E. coli BL21(DE3)/pTO17SG (HM 10411, Núm. de acceso KCCM-10152), E. coli BL21(DE3)/pTO17TG (HM 10413), E. coli BL21 (DE3)/pTO17AG (HM 10414), E. coli BL21 (DE3)/pTO17GG (HM 10415), E. coli BL21(DE3)/pBAD2M3VG (HM 10510, Núm. de acceso KCCM-10153), E. coli BL21(DE3)/pBAD17SG (HM 10511) y E. coli BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG (HM 10512).
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (b), el sobrenadante que contiene hG - CSF se separa del sedimento celular por extracción osmótica.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la extracción osmótica se realiza tratando el sedimento celular con una solución tampón que contenía sacarosa del 10% al 30% para obtener un sedimento celular por centrifugación, añadiendo agua destilada al sedimento celular y luego realizando la centrifugación.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (c), el pH del sobrenadante se ajusta de 5,0 a 5,8 por tratamiento con ácido.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido de la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido fosfórico y ácido cítrico.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa (d) se realiza utilizando una columna seleccionada del grupo que consiste en sefarosa, sefadex, agarosa, sefacel, poliestireno, poliacrilato, celulosa y Toyoperl.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa (d) se lleva a cabo utilizando una columna SP-sepharose.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa (d) se lleva a cabo utilizando una solución tampón que contiene ácido acético dentro del pH que oscila de pH 4,0 a 6,0 con una concentración de sal de 200 a 500 mM.
- 35 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa (d) se lleva a cabo utilizando una solución tampón que contiene cloruro de sodio de 200 a 500 mM y acetato de sodio de 5 a 20 mM a pH de 5,0 a 6,0.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa (e) se lleva a cabo utilizando una columna de sefarosa, Bio - Gel A o Minileak que tiene un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo, isoalquilo, neoalquilo y oligoetilenglicol.
- 40 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa (e) se realiza utilizando una columna de butil-sefarosa.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa (e) se lleva a cabo utilizando una solución tampón dentro de un pH que varía de pH 7,0 a 8,5 con una concentración de sal de 0 a 100 mM.
- 45 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa (e) se realiza utilizando una solución tampón que contiene Tris de 5 a 20 mM a pH de 7,0 a 8,0.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (f) se realiza utilizando una columna seleccionada del grupo que consiste en Q-sepharose, Macro-Prep Q, Q-HyperD y Fractogel EMD-TMAE 650.
- 5 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (f) se lleva a cabo utilizando una columna Q-sepharose.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (f) se lleva a cabo utilizando una solución tampón dentro de un pH que varía de pH 6,5 a 8,5 con una concentración de sal de 100 a 300 mM.
- 10 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (f) se lleva a cabo utilizando una solución tampón que contiene cloruro sódico de 100 a 300 mM, Tris de 5 a 20 mM y urea 50 a 200 mM a pH 7,0 a 8,0.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

