

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 483**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012 PCT/KR2012/006564**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025079**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012 E 12823797 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2753634**

54 Título: **Método para preparar la forma activa de la proteína de fusión TNRF-Fc**

30 Prioridad:

17.08.2011 KR 20110081854

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

26.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WON, HYE SOON;
SUNG, BYUNG JE;
AHN, YONG HO y
PARK, SANG KYUNG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 651 483 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).

DESCRIPCION

Método para preparar la forma activa de la proteína de fusión TNFR-Fc

Campo de la invención.

5 La presente invención se refiere a un método para preparar una proteína de fusión TNFR-Fc usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Más en particular, la presente invención se refiere a un método para preparar una proteína activa de alta pureza a partir de una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc y formas recortadas de las mismas debido al efecto de desplazamiento ajustando la conductividad de una muestra de proteína con una alta concentración de solución de sal y ajustando una cantidad de carga de la misma.

Fundamentos de la técnica.

10 Se sabe que la sobreexpresión de TNF alfa (factor de necrosis tumoral alfa) en el cuerpo humano es causa de enfermedades autoinmunitarias. El TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) es un receptor alfa del TNF y se une a un TNF alfa sobreexpresado para actuar como agente terapéutico para enfermedades autoinmunitarias. Además, el TNFR se fusiona con la región Fc de inmunoglobulina G (IgG) humana para expresarse como una proteína de fusión con Fc, usándose de este modo como un fármaco proteico terapéutico.

15 El TNFR-Fc se puede preparar por fusión de 235 aminoácidos de TNFR con 232 aminoácidos de la región Fc que incluye una región bisagra. Cuando el TNFR-Fc se produce como un dímero mediante tecnología de ADN recombinante, muestra actividad biológica.

20 El TNFR comprende 235 aminoácidos que poseen 4 dominios y una región transmembrana. El TNFR tiene 22 cisteínas, y todas ellas forman enlaces disulfuro para tener una estructura estérica. Sin embargo, cuando el TNFR-Fc es producido a partir de células animales, las cisteínas se unen entre sí al azar y por tanto no forman enlaces disulfuro idénticos a los de una proteína nativa. El TNFR también puede estar parcialmente truncado y no consigue formar un dímero TNFR-Fc correcto.

25 El TNFR-Fc con enlaces disulfuro incorrectos no puede mostrar la actividad biológica apropiada debido a una reducción drástica en la capacidad de unión a TNF alfa. Cuando la totalidad o una parte del TNFR se trunca, también puede no exhibir actividad biológica.

Por tanto, cuando los dímeros de TNFR-Fc se producen utilizando una tecnología de ADN recombinante y una técnica de cultivo de células animales, las proteínas activas, proteínas inactivas con enlaces disulfuro incorrectos, agregados y formas recortadas se producen al mismo tiempo, y por ello se necesita una técnica para aislar las proteínas activas de la mezcla de proteínas.

30 Las biomoléculas terapéuticas han de ser purificadas con más del 99% de pureza antes del empleo en seres humanos. Este grado de purificación puede conseguirse por medio del uso de tres o cuatro procesos de cromatografía de líquidos, como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de afinidad (colorante, metal, anticuerpo, proteína A, etc.) y cromatografía de interacción hidrófoba, que se requieren durante el proceso de aislamiento. El uso de cromatografía de interacción hidrófoba en la purificación de proteínas recombinantes tales como la proteína recombinante TNFR-Fc se describe en los documentos WO2005/075498, WO2005/042569 y WO03/072060. El manual "Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography – Principles and Methods" (1 de febrero 2006 y disponible en Internet) describe métodos y condiciones para el uso de cromatografía de interacción hidrófoba en la purificación de proteínas. El tipo y la secuencia de los procesos cromatográficos seleccionados se basan en las características fisicoquímicas de los contaminantes que coexisten con la biomolécula diana. Normalmente, la cromatografía de exclusión por tamaños se emplea en una etapa final, porque elimina los agregados de proteínas y también intercambia las proteínas purificadas en el tampón de formulación final.

45 Sin embargo, la cromatografía de exclusión por tamaños afecta negativamente a la productividad debido al limitado volumen de muestra que se puede cargar. Un volumen de carga de muestra en la columna mayor que aproximadamente el 5% del volumen global de la columna tiene por resultado una extensión y dilución de banda relacionadas con la difusión a medida que la banda de soluto se desplaza a través de la columna. La limitación de volumen se puede eludir usando una etapa de concentración por ultrafiltración con anterioridad a la carga de la columna. La concentración por ultrafiltración también introduce pérdidas de productividad debido a la unión no específica a la membrana y a otros materiales del sistema, pérdidas de volumen por tubos y bombas, y complicaciones asociadas con la preparación, funcionamiento y limpieza del equipo. Por tanto, el proceso de purificación puede ser claramente más simple y se pueden evitar las pérdidas de productividad aplicando una proteína diana concentrada a la cromatografía de interacción hidrófoba para obtener un efecto de desplazamiento. Sin embargo, el método de separación de la proteína diana usando cromatografía de interacción hidrófoba requiere diferentes condiciones de separación que dependen del tipo de proteína diana, incluyendo el vector de expresión un polinucleótido que codifica la proteína, etc. Frecuentemente, los métodos conocidos de separación de la proteína diana no pueden aplicarse en la separación de otras proteínas diana o en la separación de la proteína diana preparada bajo condiciones diferentes. En el mercado de fármacos proteicos, por tanto, es muy importante investigar

las condiciones adecuadas para separar una proteína diana deseada con una pureza y una concentración elevadas.

Descripción de la invención.

Problema técnico.

5 Basándose en estos antecedentes, los presentes inventores han hecho grandes esfuerzos para separar una forma activa de la proteína de fusión TNFR-Fc con una pureza y una concentración elevadas. Como resultado, han encontrado que solamente la fracción de proteína de fusión TNFR-Fc activa puede ser recuperada con pureza elevada usando cromatografía de interacción hidrófoba que tiene la ventaja de una baja probabilidad de desnaturalización de la proteína sin usar un solvente orgánico ajustando la cantidad de carga de una muestra de proteína por unidad de volumen de medio y ajustando la conductividad de la misma, a diferencia de las técnicas convencionales, rematando así la presente invención.

Solución del problema.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una forma activa de proteína de fusión TNFR (receptor de factor de necrosis tumoral) – Fc usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

Efectos ventajosos de la invención.

15 La presente invención ofrece un método para preparar una proteína activa a partir de una muestra que comprende una mezcla de proteína usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) ajustando la conductividad de la muestra de proteína empleando una alta concentración de solución salina y ajustando la cantidad de carga de la misma. Por tanto, el método puede aplicarse para el aislamiento de una proteína activa de alta pureza a partir de proteínas recombinantes que se producen a partir de células animales mediante tecnología de ADN recombinante.

20 Breve descripción de los dibujos.

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra el método de clonación de pcDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS de la presente invención.

La FIG. 2 es un mapa de segmentación que muestra pcDNA3.1-kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS, que es un vector de expresión recombinante que incluye un gen que codifica TNFR-II-Fc de la presente invención.

25 La FIG. 3 muestra un cromatograma de interacción hidrófoba (HIC) que utiliza el citrato sódico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 4 muestra un cromatograma de interacción hidrófoba (HIC) que utiliza el sulfato sódico de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 La FIG. 5 muestra un cromatograma de interacción hidrófoba (HIC) que utiliza el cloruro sódico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 6 muestra el análisis de HPLC hidrófoba de cada fracción de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 7 muestra el análisis de exclusión por tamaños (SE)-HPLC de cada fracción de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 La FIG. 8 muestra la actividad biológica *in vitro* de cada fracción de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 9 muestra un ciclo de interacción hidrófoba (HIC) cuando la proteína se carga en una cantidad de 9,5 g/L de lecho de acuerdo con una realización de la presente invención. Y

40 La FIG. 10 muestra un cromatograma de interacción hidrófoba (HIC) cuando la proteína se carga en una cantidad de 13 g/L de lecho de acuerdo con una realización de la presente invención.

Mejor modo de llevar a cabo la invención.

En un aspecto para conseguir los objetos anteriores la presente invención proporciona un método para preparar una forma activa de proteína de fusión TNFR (receptor de factor de necrosis tumoral) - Fc utilizando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

45 Preferiblemente, el método puede comprender a) cargar una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc producidas en células de mamífero en una cantidad de 10 a 14 g/L de lecho por volumen de resina de cromatografía, en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) preequilibrada con un tampón de equilibrado que comprende una o más sales elegidas en el grupo que consiste en citrato sódico, sulfato sódico y fosfato sódico; b) lavar la columna con un tampón de lavado que comprende la misma sal que en el tampón de

equilibrado para eliminar las formas recortadas de la proteína de fusión TNFR-Fc de la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc; y c) eluir de la columna la forma activa de la proteína de fusión TNFR-Fc con un tampón de elución que tiene una concentración salina menor que la del tampón de equilibrado, en donde la muestra que comprende la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc se ajusta para que tenga una conductividad de 50 a 75 mS/cm antes de la carga, pero el método no está limitado a ello.

Cuando la proteína de fusión TNFR-Fc es producida por una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión TNFR-Fc, las cisteínas de la proteína TNFR se unen entre sí al azar, y así no forman enlaces disulfuro idénticos a los de una proteína TNFR nativa o la proteína TNFR también está parcialmente truncada, y por tanto fracasa en la formación de un dímero TNFR-Fc correcto, además de la formación de una forma dímera de proteína de fusión TNFR-Fc que se une a TNF-alfa y muestra actividad biológica. Por tanto, cuando la proteína de fusión TNFR-Fc se produce en una célula hospedadora, existe la necesidad de separar solamente la proteína de fusión TNFR-Fc activa que tiene una actividad biológica idéntica o correspondiente a la de la proteína TNFR de tipo silvestre de la mezcla de la proteína de fusión TNFR-Fc activa, proteína de fusión TNFR-Fc inactiva o agregados de proteína de fusión TNFR-Fc. El método de la presente invención es un método capaz de separar la proteína de fusión TNFR-Fc activa con alta pureza, de la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc usando cromatografía de interacción hidrófoba, y así puede ser usada de manera efectiva para el aislamiento de la proteína de fusión TNFR-Fc activa.

Como se usa en el presente texto, la expresión "proteína TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral)" significa una proteína receptora que se une a TNF- α . El TNFR incluye proteína TNFRI(p55) o proteína TNFRII(p75), preferiblemente puede ser una proteína TNFRII, pero no está limitado a ella. El TNFRII puede ser intercambiable con TNFRSF1B (miembro 1B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral). La proteína TNFRII puede ser una proteína TNFRII que tiene 4 dominios y una región transmembrana, y que contiene 235 aminoácidos, pero sin limitarse a ello. Puede obtenerse información acerca de la proteína TNFRI y de la proteína TNFRII a partir de las bases de datos conocidas, tales como US NIH GenBank y, por ejemplo, puede ser una proteína que tiene el número de registro NP_001056 o P20333, pero no se limita a ello.

La proteína TNFR tiene una actividad biológica de unión con TNF- α , de la cual se sabe que la sobreexpresión en el cuerpo humano es causa de diversas enfermedades, y por tanto puede usarse para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF- α tales como enfermedades autoinmunitarias. Para conseguir esto, la región Fc de la inmunoglobulina se fusiona con la proteína TNF- α para preparar una proteína de fusión que tiene una vida mitad más alta.

Como se usa en el presente texto, la expresión "proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) - Fc" significa un producto resultante del enlace de la totalidad o de una parte de la proteína TNFR con la región Fc de la inmunoglobulina mediante acción enzimática, o resultante de la expresión de dos polipéptidos en un único polipéptido por manipulación genética. En la proteína de fusión TNFR-Fc, la proteína TNFR y la región Fc de la inmunoglobulina pueden estar enlazadas directamente entre sí, o unidas por medio de un enlazador peptídico, pero sin estar limitadas a ello.

La proteína de fusión TNFR-Fc se puede preparar por fusión de la totalidad o de una parte de la proteína TNFR con la región Fc de la inmunoglobulina y, por ejemplo, por fusión de los aminoácidos de las posiciones 1 a 235 de la proteína TNFRII con 232 aminoácidos de la región Fc de la inmunoglobulina que incluye una región bisagra, pero sin limitarse a ello. Además, la proteína de fusión TNFR-Fc puede optimizarse con codones, para la expresión en las células hospedadoras. Por ejemplo, la proteína de fusión TNFR-Fc puede ser una proteína de fusión TNFR-Fc codón-optimizada para células CHO, definida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, pero sin limitarse a ello. La proteína de fusión TNFR-Fc incluye una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1, y todas las proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que tienen una homología con la secuencia del 70% o más, preferiblemente una homología del 80% o más, más preferiblemente una homología del 90% o más, mucho más preferiblemente una homología del 95% o más, y lo más preferiblemente una homología del 98% o más, siempre y cuando las proteínas tengan actividad de unión a TNF- α . Es evidente que cualquier tipo de variante de proteína que tenga una delección, modificación, sustitución o adición de alguna secuencia puede estar dentro del alcance de la presente invención, siempre y cuando la secuencia que tiene la homología sea una secuencia de aminoácidos que tenga una actividad biológica que sea o similar a la proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) - Fc. Además, el polinucleótido que codifica la proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) - Fc incluye una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2, y todas las secuencias de nucleótidos que tienen una homología con la secuencia del 70% o superior, preferiblemente una homología del 80% o superior, más preferiblemente una homología del 90% o superior, mucho más preferiblemente una homología del 95% o superior, y lo más preferiblemente una homología del 98% o superior, siempre y cuando las secuencias de nucleótidos codifiquen sustancialmente las proteínas que tienen una actividad de unión a TNF- α . También es evidente que cualquier tipo de secuencia de nucleótidos que codifica variantes de proteínas que tienen una delección, modificación, sustitución o adición de alguna secuencia, puede estar dentro del alcance de la presente invención, siempre y cuando la secuencia que tiene la homología sea una secuencia de nucleótidos que codifique un secuencia de aminoácidos que tiene una actividad biológica que es sustancialmente idéntica o que corresponde a la proteína de fusión TNFR-Fc. En una realización de la presente invención, se realizó una optimización de codones específica para células CHO.

Como se usa en el presente texto, la expresión "región Fc de la inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una parte de la inmunoglobulina que contiene la región constante de cadena pesada 2 (CH2), la región constante de cadena pesada 3 (CH3) y una región bisagra, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. La región Fc de la inmunoglobulina de la presente invención incluye una secuencia nativa de aminoácidos y una secuencia derivada de la misma. Un derivado de la secuencia de aminoácidos es una secuencia que es distinta de la secuencia nativa de aminoácidos debido a una deleción, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Además, la región Fc de la inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD, o que se hace mediante combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferiblemente se deriva de IgG, que se sabe que potencia la vida mitad de las proteínas de unión. Más preferiblemente, se deriva de IgG1, pero sin limitarse a ello.

Por otra parte, el término "combinación", como se usa en el presente texto, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de la inmunoglobulina de cadena simple del mismo origen están unidos a un polipéptido de cadena simple de un origen diferente para formar un dímero o un multímero. Es decir, se puede formar un dímero o un multímero a partir de dos o más fragmentos elegidos entre el grupo que consiste en los fragmentos IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc e IgE Fc.

El término "híbrido", como se usa en el presente texto, significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de la inmunoglobulina de origen distinto están presentes en una región Fc de la inmunoglobulina de cadena simple. En la presente invención, son posibles varios tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios elegidos entre el grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc e IgD Fc, y pueden incluir la región bisagra. Por otro lado, la IgG también se divide en subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de las mismas.

La proteína de fusión TNFR-Fc puede obtenerse introduciendo el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión en células de mamífero, y luego expresándolo en ellas, y, por ejemplo, introduciendo un vector que comprende un polinucleótido que codifica la enzima GS (glutamina sintetasa) mutada y la proteína de fusión TNFR-Fc en células de mamífero, pero sin limitarse a ello.

La enzima GS mutada es una enzima que tiene una secuencia que contiene una sustitución de Arginina (R) por Glicina (G) en la posición 299 en la secuencia de aminoácidos de la enzima GS de tipo silvestre, y el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión TNFR-Fc de la presente invención puede incluir la enzima GS mutada. Un ejemplo de ello puede ser un vector pcDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS, pero sin limitarse al mismo.

En la presente invención, se usó el vector pcDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS como vector de expresión representativo que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión TNFR-Fc, y se transformó en células CHO para expresar la proteína de fusión TNFR-Fc. La mezcla de varias formas de proteínas de fusión TNFR-Fc tales como la proteína de fusión TNFR-Fc activa, las formas recortadas de la proteína de fusión TNFR-Fc, la proteína de fusión TNFR-Fc inactiva, y/o el agregado de proteína de fusión TNFR-Fc se incluyen en las proteínas de fusión TNFR-Fc obtenidas por el método anterior. Por tanto, es necesario aislar solo la proteína de fusión TNFR-Fc activa que tiene una actividad biológica de unión a TNF-alfa. Cuando se usa el método de preparación de la presente invención, la proteína de fusión activa y el agregado pueden obtenerse como fracciones separadas, y por tanto solo la proteína de fusión activa se puede obtener con alta pureza.

El método para preparar la proteína de fusión TNFR-Fc activa de la presente invención comprende a) cargar una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) preequilibrada con un tampón de equilibrado.

La etapa a) es una etapa de carga de la muestra en la columna HIC preequilibrada con un tampón de equilibrado.

El preequilibrado de la columna se realiza tratando dicha columna con una alta concentración de solución salina para equilibrar la resina de la columna de cromatografía.

Un ejemplo de solución salina de alta concentración puede ser una solución tampón que comprende una o más sales seleccionadas entre el grupo que consiste en citrato sódico, sulfato sódico y fosfato sódico, pero el tipo de solución salina no está particularmente limitado siempre y cuando sea capaz de equilibrar la columna de cromatografía de interacción hidrófoba de la presente invención. Por ejemplo, se puede usar citrato sódico o sulfato sódico como sal, pero la sal no se limita a ellos. Si el tampón de equilibrado comprende citrato sódico como sal, su concentración puede ser de 0,45 a 0,55 M, y el tampón de equilibrado puede comprender además de 50 a 100 mM de fosfato sódico, pero sin limitarse a ello. Además, si el tampón de equilibrado comprende sulfato sódico como sal, su concentración puede ser de 0,70 a 0,72 M, y el tampón de equilibrado puede comprender además de 50 a 100 mM de fosfato sódico, pero sin limitarse a ello. Además, el pH del tampón de equilibrado puede ser preferiblemente de 6,5 a 7,0, pero no se limita a ello. Más preferiblemente, el tampón de equilibrio puede ser un tampón que comprende de 0,48 a 0,52 M de citrato sódico y de 50 a 70 mM de fosfato sódico a pH de 6,7 a 6,9, o un tampón que comprende 0,71 a 0,72 M de sulfato sódico y de 50 a 70 de fosfato sódico a pH de 6,7 a 6,9, y lo más

preferiblemente puede ser un tampón que comprende citrato sódico 0,5 M y fosfato sódico 50 mM a pH 6,8, o un tampón que comprende 0,72 M de sulfato sódico y 50 mM de fosfato sódico a pH 6,8, pero sin limitarse a ello.

5 En una realización de la presente invención, el tampón que comprende citrato sódico 0,5 M y fosfato sódico 50 mM a pH 6,8, y el tampón que comprende 0,72 M de sulfato sódico y 50 mM de fosfato sódico a pH 6,8 se usaron como tampón de equilibrado.

10 Como se usa en el presente texto, la expresión "cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)" se usa en el proceso de purificación de biomoléculas, y se basa en una interacción reversible entre la superficie de una proteína y un adsorbente de cromatografía de interacción hidrófoba. Es muy útil en la separación de contaminantes que tienen un punto isoeléctrico o un peso molecular similar al de la proteína isoforma, en comparación con la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de exclusión por tamaños.

15 El tipo de ligando utilizado en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba no está limitado particularmente, siempre y cuando el ligando se pueda usar para la separación de la proteína de fusión TNFR-Fc activa de la presente invención, y los ejemplos de los mismos pueden incluir un grupo butilo, un grupo octilo, un grupo fenilo y un grupo alquilo. El ligando puede ser preferiblemente el grupo butilo o fenilo, y más preferiblemente, el grupo butilo, pero no se limita a ellos. En una realización de la presente invención, se usó butil Sepharose 4 Fast Flow que contiene ligandos de butilo, fabricada por GE Healthcare. La Butil Sepharose 4 Fast Flow utilizada se basa en perlas de 90 µm de matriz de agarosa al 4% altamente entrecruzada con ligandos de butilo acoplados por medio de enlaces éter, y tiene elevadas estabildades químicas, físicas y térmicas. Debido a la alta hidrofobicidad del medio, puede usarse para separar proteínas hidrófilas.

20 El método para preparar la proteína de fusión TNFR-Fc activa de la presente invención comprende la etapa de a) cargar una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc en la columna preequilibrada.

25 Como se usa en el presente texto, la expresión "una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc" puede ser un sobrenadante de cultivo de células que comprende las proteínas de fusión TNFR-Fc, un extracto celular o el sobrenadante del cultivo celular o extracto celular parcialmente purificado, pero no se limita a ello. Cuando las proteínas de fusión TNFR-Fc se producen en las células hospedadoras, la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc activas, proteínas de fusión TNFR-Fc recortadas que tienen delecciones parciales de las proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión TNFR-Fc inactivas con enlaces disulfuro incorrectos, y/o los agregados de proteína de fusión TNFR-Fc están incluidos en el sobrenadante del cultivo celular o extracto celular.

30 La proteína de fusión TNFR-Fc se expresa preferiblemente en las células de mamífero introducidas con el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y se recupera el sobrenadante. Luego se puede purificar parcialmente por uno o más métodos seleccionados entre el grupo que consiste en cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y desalación, antes de cargarla en la cromatografía de interacción hidrófoba, pero sin limitarse a ello.

35 Como se usa en el presente texto, la expresión "parcialmente purificado" significa que existen proteínas distintas de la proteína de fusión TNFR-Fc activa deseada, incluso después de realizar uno o más procedimientos de fraccionamiento tales como cromatografía. En una realización de la presente invención, la purificación parcial del sobrenadante de cultivo se llevó a cabo usando cromatografía de Proteína A.

40 La mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc puede ser una muestra de proteínas mixta, cuya conductividad se ajusta con la concentración elevada de solución salina, antes de cargarla en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba. La solución salina puede ser una solución que comprende una sal elegida entre el grupo que consiste en citrato sódico, sulfato sódico y sulfato amónico, pero sin limitarse a ellos. La conductividad de la muestra de proteína de fusión TNFR-Fc tratada con la elevada concentración de solución salina, se ajusta preferiblemente en el margen de 50 a 75 mS/cm.

45 Cuando la alta concentración de solución salina es una solución que comprende citrato sódico, la conductividad se ajusta preferiblemente en el margen de 50 a 55 mS/cm, y cuando la alta concentración de la solución salina es una solución que comprende sulfato sódico, la conductividad se ajusta preferiblemente dentro del margen de 65 a 75 mS/cm, pero sin limitarse a ello. La muestra de proteína tiene preferiblemente la concentración de citrato sódico de 0,45 a 0,55 M, más preferiblemente 0,48 a 0,52 y lo más preferiblemente 0,5 M. La muestra de proteína tiene preferiblemente la concentración de sulfato sódico de 0,70 a 0,72 M, más preferiblemente 0,71 a 0,72, y lo más preferiblemente 0,72 M. Además, el pH de la muestra de proteína puede ser de 6,5 a 7,0, pero sin limitarse a ello.

50 En una realización de la presente invención, la muestra de proteína de fusión TNFR-Fc se ajustó para tener una conductividad de 50 a 52 mS/cm usando una solución salina que contiene citrato sódico, y en ese momento la concentración final de citrato sódico era 0,5 M. Además, la muestra se ajustó para tener una conductividad de 65 a 75 mS/cm usando una solución de sal que contenía sulfato sódico, y en ese momento la concentración final de sulfato sódico era 0,72 M (Ejemplo experimental 1). En la presente invención, la cromatografía de interacción hidrófoba también se llevó a cabo usando cloruro sódico como sal, además de citrato sódico y sulfato sódico. Sin embargo, las proteínas de fusión TNFR-Fc activas no se unieron a la columna incluso a una alta concentración de cloruro sódico desde 0,75 M a 1,5 M, y se recuperaron como una fracción de flujo dinámico (Figuras 3 a 5), lo que

indica que el tipo y la concentración de sal utilizada también son factores importantes en el método de la presente invención.

En la etapa a), la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc puede cargarse en una cantidad de 10 a 14 g/L de lecho por volumen de resina de cromatografía para facilitar la separación de proteínas por efecto de desplazamiento.

5 Como se usa en el presente texto, la expresión "efecto de desplazamiento" significa un fenómeno en el que un analito que tiene una capacidad de unión más débil no se retiene en la resina de la columna y se eluye rápidamente cuando existe un analito que tiene una capacidad de unión más fuerte a una concentración elevada. En la presente invención, el analito diana, la proteína de fusión TNFR-Fc activa, puede separarse fácilmente de la proteína inactiva y de los agregados de proteína solamente ajustando la conductividad porque hay una gran diferencia de hidrofobicidad entre ellos. Sin embargo, la proteína activa no puede separarse fácilmente de las proteínas recortadas usando la cromatografía de interacción hidrófoba existente, debido a una pequeña diferencia de hidrofobicidad entre ellas. La presente invención se caracteriza porque la fracción de proteína recortada puede eliminarse fácilmente de la proteína activa mediante el efecto de desplazamiento cuando la cantidad de carga de la muestra de proteína se ajusta dentro del margen de 10 a 14 g/L de lecho por volumen de resina de cromatografía. Más preferiblemente, la muestra de proteína puede cargarse en una cantidad de 12 a 14 g/L de lecho por volumen de resina de cromatografía. En una realización de la presente invención, los efectos del desplazamiento se compararon de acuerdo con la cantidad de carga de proteína. Cuando la muestra de proteína se cargó en una cantidad de 9,5 g/L de lecho inferior a 10 g/L de lecho, la fracción de proteína de fusión TNFR-Fc recortada y la fracción de proteína de fusión TNFR-Fc activa no se separaron fácilmente. En cambio, cuando la muestra de proteína se cargó en una cantidad de 13 g/L de lecho, la fracción recortada y la fracción activa se separaron claramente (Ejemplo Experimental 5, Figuras 9 y 10).

Además, el método de la presente invención comprende la etapa de b) lavado de la columna con un tampón de lavado para separar y eliminar la fracción de proteína de fusión TNFR-Fc recortada.

25 El tampón de lavado puede tener la misma composición que en el tampón de equilibrado, pero no se limita a ello. Cuando la columna se lava con el tampón de lavado, las proteínas de fusión TNFR-Fc recortadas se eluyen. En este momento, el pico eluido se designa como Pico 1 en la presente invención.

30 En una realización de la presente invención, la columna se lavó con el tampón de equilibrado utilizado, para eliminar las proteínas recortadas. A este respecto, el tampón de equilibrado utilizado fue un tampón que comprendía citrato sódico 0,5 M y fosfato sódico 50 mM a pH 6,8, o un tampón que comprendía sulfato sódico 0,72 M y fosfato sódico 50 mM a pH 6,8.

Además, el método de la presente invención incluye la etapa de c) elución de la columna de la proteína de fusión TNFR-Fc activa con un tampón de elución que tiene una concentración de sal menor que el tampón de equilibrado.

35 En la cromatografía de interacción hidrófoba, cuanto más hidrófoba es la molécula menor cantidad de sal se necesita para promover la unión a la columna. Así pues, las proteínas de fusión TNFR-Fc activas pueden separarse de las proteínas de fusión TNFR-Fc inactivas o los agregados de proteína de fusión TNFR-Fc ajustando la concentración de sal, porque hay una diferencia de hidrofobicidad entre ellas. En la etapa anterior, por tanto, la proteína de fusión TNFR-Fc activa se eluye de la columna reduciendo la interacción entre la proteína de fusión TNFR-Fc activa y el ligando hidrófobo usando el tampón de elución que tiene una concentración de sal menor que el tampón de equilibrado. En la presente invención, el pico que tiene la proteína de fusión TNFR-Fc activa se designa como Pico 2.

40 El tampón de elución es un tampón que tiene una concentración de sal menor que el tampón de equilibrado y el tampón de lavado, y su conductividad puede ser de 40 a 47 mS/cm. Cuando se utiliza un tampón de elución que comprende citrato sódico, el tampón de elución puede comprender citrato sódico a una concentración de 0,35 a 0,4 M, más preferentemente de 0,38 a 0,4 M, y lo más preferentemente 0,4 M, pero sin limitarse a ello. Cuando se usa un tampón de elución que comprende sulfato sódico, el tampón de elución puede comprender sulfato sódico a una concentración de 0,35 a 0,56 M, más preferentemente de 0,38 a 0,4 M y lo más preferentemente 0,4 M, pero sin limitarse a ello. Además, el tampón de elución comprende también 50 a 100 mM de fosfato sódico, pero no se limita a ello. En una realización de la presente invención, se usó un tampón de elución que comprendía 0,4 M de citrato sódico y 50 mM de fosfato sódico a pH 6,8 y un tampón de elución que comprendía 0,4 M de sulfato sódico y 50 mM de fosfato sódico a pH 6,8. El pH del tampón de elución puede estar dentro del intervalo de 6,5 a 7,0, pero sin limitarse a ello. Después de realizar la etapa c), la conductividad pasa a ser de 40 a 47 mS/cm.

El método para preparar la proteína de fusión TNFR-Fc activa puede comprender además la etapa de d) separación de una fracción que comprende las proteínas de fusión TNFR-Fc inactivas o los agregados de proteína de fusión TNFR-Fc de la columna.

55 La etapa anterior es una etapa de elución de la fracción que comprende las proteínas inactivas y los agregados de proteínas con un tampón que comprende una concentración de sal menor que el tampón de elución o un tampón que no tiene citrato sódico o sulfato sódico. En este momento, el pico eluido se designa como Pico 3 en la presente invención. El tampón a usar puede tener un pH de 6,5 a 7,0 y citrato sódico de 0 a 0,1 M o sulfato sódico de 0 a 0,1

5 M, pero sin limitarse a esto. Además, el tampón puede tener un pH que oscila entre 6,5 y 7,0, pero sin limitarse a ello. Además, el tampón puede tener una conductividad de 4 a 6 mS/cm, puede comprender fosfato sódico de 50 a 70 mM, y/o puede tener un pH de 6,7 a 6,9, pero sin estar limitado a esto. En una realización de la presente invención, se usó un tampón que comprendía fosfato sódico 50 mM y pH 6,8, y la conductividad se ajustó entre 4 y 6 mS/cm.

10 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un método para separar las proteínas activas de la mezcla de las proteínas recortadas, los agregados de proteínas, las proteínas inactivas y las proteínas activas, usando cromatografía de interacción hidrófoba. Este método se caracteriza porque las proteínas recortadas que tienen una capacidad de unión más débil se pueden eliminar de las proteínas activas debido al efecto de desplazamiento ajustando la conductividad de la muestra cargada en la columna usando una alta concentración de solución salina y aumentando la cantidad de carga de la misma. Este método también se caracteriza porque las proteínas de fusión TNFR-Fc activas deseadas se pueden separar y preparar a una alta concentración ajustando la concentración de una sal particular de cromatografía de interacción hidrófoba.

15 De acuerdo con una realización de la presente invención, el vector de expresión que comprende los polinucleótidos que codifican GS que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 299 y la proteína de fusión TNFR-II-Fc fue transformado en células animales, CHO (Ejemplos 1 a 4) y las proteínas de fusión TNFR-II-Fc fueron obtenidas a partir del mismo. A continuación, se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba para separar la proteína de fusión TNFR-II-Fc activa (Ejemplo Experimental 1). Cuando las proteínas de fusión TNFR-II-Fc se separan por el método de la presente invención, la proteína de fusión TNFR-II-Fc recortada, la proteína de fusión TNFR-II-Fc activa y los agregados de proteína de fusión TNFR-II-Fc se separaron como Picos 1, 2 y 3, respectivamente (Figuras 3, 6 y 7). Además, cuando la muestra de proteína fue cargada en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba en una cantidad de 12 g/L de lecho o más, el pico correspondiente a las proteínas recortadas no separadas cuando se cargó en una cantidad de 9,5 g/L de lecho o menos se separó del pico de proteína activa (Figuras 9 y 10), y se encontró que el analito correspondiente al pico de proteína activa obtenido tenía una actividad similar a la de la forma activa pura (FIG. 8). De acuerdo con las técnicas convencionales de purificación de los dímeros de TNFR-II-Fc, se separaron dos fracciones, es decir, una fracción que incluye las proteínas activas y una fracción que incluye todas las proteínas inactivas, los agregados de proteínas y las proteínas recortadas. Sin embargo, no ha habido publicaciones acerca de la separación de tres fracciones, es decir, una fracción que incluye una gran cantidad de proteínas recortadas, una fracción que incluye las proteínas activas, y una fracción que incluye las proteínas inactivas y los agregados de proteínas. En la presente invención, estas tres fracciones fueron separadas, y se encontró que la actividad de la fracción que comprende la proteína de fusión TNFR-II-Fc activa era similar a la de la forma activa pura, lo que indica que el método de la presente invención es capaz de preparar la proteína de fusión TNFR-II-Fc activa con alta pureza, en comparación con las técnicas convencionales.

35 Por tanto, el método de la presente invención se puede usar para purificar las proteínas de fusión TNFR-II-Fc activas de alta pureza (por ejemplo, etanercept) que tienen actividad biológica, mediante la eliminación de las proteínas de fusión TNFR-II-Fc recortadas, que se separan con dificultad por métodos convencionales.

Las descripciones del método y de la proteína de fusión TNFR-Fc son las mismas que antes.

Modo para la invención.

40 En adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solamente para fines ilustrativos, y la invención no pretende limitarse a ellos.

Ejemplo 1: Síntesis del gen que codifica la proteína de fusión TNFR-II-Fc.

Para examinar el nivel de expresión de una proteína recombinante producida usando un sistema de vector de expresión de proteína recombinante, se usó una proteína de fusión TNFR-II-Fc como proteína deseada.

45 El gen que codifica la proteína de fusión (SEQ ID NO. 2) fue sintetizado por GeneArt Inc., para satisfacer los siguientes criterios: (1) debe incluir una secuencia señal TNFR, (2) debe expresar los aminoácidos de TNFR en posición de 1 a 235, (3) debe ser codón-optimizado para células CHO con el fin de transfectarse en células CHO, (4) debe tener un sitio de restricción NheI en el extremo 5' y un sitio de restricción NotI en el extremo 3', considerando la inserción en un vector pcDNA3.1 de Invitrogen.

50 La secuencia de bases del gen que codifica la proteína de fusión sintetizada fue finalmente analizada usando un programa VectorNTI.

Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión que incluye el gen que codifica la proteína de fusión TNFR-II-Fc.

Con el fin de adquirir un sistema de DHFR, que es un sistema común de expresión de proteína recombinante, se clonó un gen de DHFR (dihidrofolato reductasa) de hámster.

55 Específicamente, para obtener el gen de DHFR de hámster, se adquirió un vector pSVA3 (ATCC 77273) que tenía un tipo mutante de gen DHFR de hámster, y luego se obtuvo un gen de DHFR de tipo silvestre mediante la mutación

puntual utilizando el gen DHFR como plantilla. Además, se obtuvo una secuencia IRES por PCR a partir de un vector de Clontech (Cat. nº 6029-1, PT3267-5) que tiene la secuencia de ADN correspondiente.

El gen DHFR obtenido y la secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) se clonaron en un vector pCR2.1 para construir un vector de expresión pCR2.1-IRES-DHFR.

- 5 El vector pCDNA3.1-TNFR-Fc insertado con TNFR-Fc obtenido en el Ejemplo 1 y el vector pCR2.1-IRES-DHFR obtenido fueron digeridos con enzimas de restricción, Sall y XbaI, y se ligaron para obtener un vector de expresión pCDNA3.1 insertado en Fc-TNFR-Fc-IRES-DHFR. Con el fin de clonarlo en un vector que tiene un gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la kanamicina se obtuvo a partir de un vector pAC-GFP (nº 632483) de Clontech, para introducir un gen Kan/Neo. El vector es un vector que tiene una secuencia de Kozak en una secuencia de iniciación de la transcripción del gen de TNFR-Fc y el gen Kan/Neo como marcador de selección de antibiótico, y se usó como un marco básico para clonar 4 sistemas de vectores de expresión diferentes con el fin de comparar los niveles de expresión de la proteína recombinante usando células CHO.

Ejemplo 3: Clonación del gen GS de hamster y preparación del vector de expresión de proteína de mamífero pCDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS.

- 15 Con el fin de adquirir el ADN de GS, se cultivó una línea celular de hámster, CHO DG44 (Invitrogen, 12609-012), y luego se aisló un ARN total usando un reactivo TRIZOL (Invitrogen). Se llevó a cabo la RT-PCR usando el ARN total obtenido para obtener ADNc. Se llevó a cabo la PCR (25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, reasociación a 50 °C durante 30 segundos, alargamiento a 72 °C durante 90 segundos y alargamiento a 72 °C durante 7 minutos) usando el ADNc obtenido como plantilla y un par de cebadores (cebador GS Sall-F, cebador GS XbaI-R) para la adquisición del siguiente gen GS, para obtener un producto de PCR.

GS Sall-F: 5'-gtcgacatggccacctcagcaagttccc-3' (SEQ ID NO. 3)

GS XbaI-R: 5'-tctagattgtttgtattggaagg-3' (SEQ ID NO. 4)

- 25 El producto de la PCR obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y luego se cortó la banda correspondiente, seguido de limpieza usando un kit de limpieza Quiagen (nº 28204). Luego, el resultante se insertó en un vector de clonación génica, vector pGEMT (Promega, EE. UU.). El vector de pGEMT insertado en el producto de PCR se introdujo en una célula TOP10 para obtener un total de 10 colonias. Se analizaron una secuencia de bases (SEQ ID NO. 5) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 6) codificada por la secuencia de bases. Como resultado, se descubrió que un aminoácido difiere de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen GS de hamster (GenBank: X03495.1) conocido en el NCBI GenBank. El gen GS clonado codifica una enzima GS que tiene una secuencia que contiene una sustitución de Arginina (R) por Glicina (G) en la posición 299 de la secuencia de aminoácidos de la enzima GS de tipo silvestre.

- 35 Un fragmento obtenido tratando pGEMT-GS con enzimas de restricción Sall y XbaI se insertó en un vector TOPO-IRES-DHFR que se digirió previamente con enzimas de restricción Sall y XbaI, para obtener un gen pCR2.1-TOPO-IRES-GS.

A continuación, para conectar el gen TNFR-Fc y el gen IREF-GS, se ligaron el gen TNFR-II-Fc-IRES-DHFR y el fragmento IRES-GS digerido con XhoI y XbaI para construir un vector kozak-TNFR-Fc-IRES-GS ("vector IRES-GS") (FIG. 1). La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra el método de clonación de pCDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS de la presente invención. Además, se muestra un diagrama esquemático del vector en la FIG. 2.

- 40 Ejemplo 4: Preparación de la muestra a aplicar a la cromatografía de interacción hidrófoba.

- Se introdujeron células CHO (ovario de hámster chino) con el vector pCDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS que comprende un gen productor de TNFR-II-Fc mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen). La línea celular CHO introducida con el gen se cultivó en un matraz o biorreactor usando un medio DMEM/F12 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS). El caldo de cultivo se filtró usando un filtro de profundidad para eliminar las células, y se realizó de nuevo una microfiltración para eliminar los restos de células. El sobrenadante se recogió y se purificó parcialmente por cromatografía de Proteína A. El pH de la fracción de purificación se ajustó dentro del intervalo de 3,6 a 3,8 usando ácido cítrico 100 mM o ácido fosfórico (pH 2,1).

- 50 Se mezcló una solución de citrato sódico 1 M y fosfato sódico 75 mM (pH 6,8) a una relación en volumen de aproximadamente 1:1. La solución se añadió bajo agitación hasta que la conductividad alcanzó de 50 a 52 mS/cm a temperatura ambiente. Después de la adición, la mezcla se filtró usando un filtro de 0,2 µm.

Ejemplo Experimental 1:

Cromatografía de interacción hidrófoba.

Ejemplo Experimental 1-1: Cromatografía de interacción hidrófoba usando citrato sódico.

5 Se empaquetó una columna de vidrio con Butil Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) en una longitud de 8 cm o más. Se preparó una solución tampón (pH 6,8) de citrato sódico 0,5 M y fosfato sódico 50 mM (denominado tampón I) y una solución tampón (pH 6,8) de fosfato sódico 50 mM (denominado tampón J).

10 Se aplicaron a la columna empaquetada tres volúmenes de columna de Tampón I como tampón de equilibrado para equilibrar la columna. Una vez terminado el equilibrado, la solución preparada en el Ejemplo 4 se aplicó a la columna en una cantidad de 12 gramos por litro de columna o más. Después de completarse la inyección, la columna se lavó con 2 veces el volumen de la columna de Tampón I como tampón de lavado. En este momento, la fracción eluida se designó como Pico 1.

15 A continuación, se hizo que el tampón de elución tuviera una composición de 80% de Tampón I y 20% de Tampón J, y después se ajustó la conductividad usando el tampón. Cuando aumentaron las señales del detector UV, se recogió una fracción. En este momento, la fracción eluida se designó como Pico 2. El Pico 2 se pudo recoger entre 1,5 a 3,5 veces el volumen de la columna.

A continuación, se hizo que el tampón tuviera una composición de 100% de tampón J, y luego la columna se lavó con 3 veces el volumen de la columna de Tampón J. En este momento, la fracción eluida se designó como Pico 3.

20 Como resultado de la cromatografía de interacción hidrófoba, se obtuvo el cromatograma de la FIG. 3. Como se muestra en la FIG. 3, el Pico 1, el Pico 2 y el Pico 3 fueron separados. Puede verse que la forma recortada se incluyó en el Pico 1, la forma activa se incluyó en el Pico 2 y la forma inactiva y los agregados de proteína se incluyeron en el Pico 3.

Ejemplo experimental 1-2: Cromatografía de interacción hidrófoba usando sulfato sódico.

25 Se empaquetó una columna con Butil Sepharose 4 Fast Flow en una longitud de 10 cm o más. Se prepararon una solución tampón (pH 6,8) de sulfato sódico 0,72 M y fosfato sódico 50 mM (denominada en adelante "Tampón S") y una solución tampón de fosfato sódico 50 mM (denominada en adelante "Tampón J").

30 Se aplicó 3 veces el volumen de la columna de Tampón S a la columna empaquetada, para equilibrar la columna. Después de terminar el equilibrado, la solución de proteína, en la que se ajustó la concentración final de sulfato sódico en 0,72 M con un tampón (pH 6,8) de 1,2 M de sulfato sódico y 50 mM de fosfato sódico, fue aplicada a la columna en una cantidad de 11 gramos por litro de columna o más. La solución de proteína tenía una conductividad que oscilaba entre 65 y 75 mS/cm. Después de completar la inyección, la columna se lavó con 2 veces el volumen de columna de Tampón S. A continuación, la composición del Tampón S se redujo a 100-30% para 30 veces el volumen de la columna y posteriormente se redujo a 30-0% para 3 veces el volumen de la columna. El cromatograma resultante de la cromatografía de interacción hidrófoba anterior se muestra en la FIG. 4.

35 Como se muestra en la FIG. 4, se descubrió que la proteína de fusión TNFR11-Fc se adsorbe sobre la columna a una concentración de sulfato sódico de 0,72 M.

Este resultado indica que la proteína de fusión TNFR11-Fc activa puede separarse usando sulfato sódico como la sal de la presente invención, además del citrato sódico.

Ejemplo experimental 1-3: Cromatografía de interacción hidrófoba usando cloruro sódico.

40 Una columna se empaquetó con Butil Sepharose 4 Fast Flow en una longitud de 10 cm o más. Se preparó una solución tampón (pH 7,2) de cloruro sódico 0,75 M y Tris-HCl 50 mM (denominada en adelante "Tampón X"), una solución tampón (pH 7,2) de cloruro sódico 1,0 M y Tris-HCl 50 mM (denominada en adelante "Tampón Y"), una solución tampón (pH 7,2) de cloruro sódico 1,5 M y Tris-HCl 50 mM (denominada en adelante "Tampón Z") y una solución tampón (pH 7,2) de Tris-HCl 50 mM (denominada en adelante "Tampón T").

45 Se aplicó 3 veces el volumen de la columna de Tampón X a la columna empaquetada para equilibrar la columna. Una vez completado el equilibrado, la solución de proteína, en la que se ajustó la concentración final de cloruro sódico en 0,75 M con un tampón (pH 7,2) de cloruro sódico 1,5 M y Tris-HCl 50 mM, se aplicó a la columna en una cantidad de 4 gramos por litro de columna o más. Una vez completada la inyección, la columna se lavó con 2 veces el volumen de la columna de Tampón X. A continuación, la composición del Tampón X se redujo a 100 - 0% para 20 veces el volumen de la columna. Además, también se realizaron los mismos procedimientos para el Tampón Y y el Tampón Z. El cromatograma resultante de la cromatografía de interacción hidrófoba anterior se muestra en la FIG. 5.

50 Como se muestra en la FIG. 5, se encontró que la proteína de fusión TNFR11-Fc no se adsorbía en la columna a la concentración de cloruro sódico elevada, y se recuperó como una fracción de flujo continuo.

Estos resultados indican que la proteína de fusión TNFRII-Fc activa de la presente invención no puede separarse solamente ajustando la conductividad, y el tipo y concentración de una sal particular es importante en la separación.

Ejemplo experimental 2: HPLC hidrófoba.

5 Las muestras obtenidas de cada etapa del Ejemplo 1-1 se sometieron a HPLC hidrófoba. En la HPLC hidrófoba, se usó una columna Butil NPR (Tosoh Bioscience), y la fase móvil A fue una solución (pH 7,0) de sulfato amónico 1,8 M y fosfato sódico 100 mM, y la fase móvil B fue una solución (pH 7,0) de fosfato sódico 100 mM. Durante los 5 minutos iniciales, la composición de la fase móvil A se mantuvo en 100% y a un caudal de 1 ml/min, seguido de un gradiente lineal de la fase móvil A del 100% al 0% durante 45 minutos. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

10 Como se muestra en la FIG. 6, en el Pico 1, una fracción de dicho Pico 1 es dominante pero coexiste con el Pico 2. Se encontró que el Pico 2 incluye una sola fracción de la forma activa. En el Pico 3, una fracción del Pico 3 solo es dominante sin la fracción de la forma activa.

Este resultado indica que el método de preparación de la proteína de fusión TNFRII-Fc de la presente invención se usa eficazmente para separar solo su forma activa.

Ejemplo experimental 3: HPLC de exclusión por tamaños (SE – HPLC).

15 Las muestras obtenidas de cada etapa del Ejemplo Experimental 1-1 se sometieron a SE-HPLC. La SE-HPLC es un método de separación de proteínas de acuerdo con su tamaño, y las proteínas recortadas y los agregados de proteínas se pueden separar de acuerdo con el tiempo de retención. Una columna TSK-GEL3000SWXL (Tosoh Bioscience, 7,8 mm DI * 30 cm H) fue equilibrada con PBS a un caudal de 1 ml/min, y se cargaron para análisis 20 µg de la proteína. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

20 Como se muestra en la FIG. 7, se observó un pico más pequeño próximo al pico principal en el Pico 1, y este pico representa las formas recortadas con un tamaño más pequeño. El Pico 2 se detectó como un único pico en SE-HPLC. En el Pico 3, se eluyeron dos picos antes del pico principal, y estos picos representan agregados proteicos.

25 Este resultado indica que el método de preparación de la proteína de fusión TNFRII-Fc de la presente invención se usa eficazmente para separar solamente la proteína de fusión TNFRII-Fc activa de la mezcla de proteínas de fusión TNFRII-Fc.

Ejemplo experimental 4: Actividad biológica in vitro.

30 Se examinó la unión de TNF alfa con las fracciones de Pico 2 y Pico 3 del Ejemplo 1-1. La fracción de Pico 2 o fracción de Pico 3 se diluyeron apropiadamente, y luego se unió a una superficie sólida recubierta con anticuerpo anti IgFc. Después del tratamiento con TNF alfa, la unión de las fracciones de Pico 2 y Pico 3 con TNF alfa se examinó mediante el desarrollo del color con HRP. Los resultados se muestran en la FIG. 8.

Como se muestra en la FIG. 8, cuando una unidad de unión se consideró como 100, el Pico 2 mostró un valor correspondiente a 100, pero el Pico 3 mostró un valor de 20 o menos, lo que indica que el método de la presente invención se realiza para separar eficazmente la forma activa de la inactiva.

35 Ejemplo experimental 5: Comparación del efecto de desplazamiento de acuerdo con la cantidad de proteína cargada en la cromatografía de interacción hidrófoba.

40 El análisis se realizó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 1-1 usando las mismas muestras, excepto que se varía la cantidad de carga de muestra por volumen de unidad de columna. En el Ejemplo experimental 1-1, se cargaron en la columna 12 g/L de lecho de la solución preparada en el Ejemplo 4, mientras que se cargaron en la columna 9,5 g/L de lecho y 13 g/L de lecho en el presente Ejemplo experimental. Los resultados se muestran en las FIGS. 9 y 10.

Como se muestra en la FIG. 9, cuando se cargó la cantidad más pequeña (9,5 g/L de lecho), el Pico 1 de la fracción de proteína recortada no se separó del Pico 2. En cambio, como se muestra en la FIG. 10, cuando se cargó la cantidad mayor (13 g/L de lecho), el Pico 1 de la fracción de proteína recortada se separó claramente del Pico 2 de la fracción de proteína activa.

45 Este resultado indica que la cantidad de proteína cargada para la purificación de la proteína de fusión TNFRII-Fc de la presente invención es un factor importante en la separación efectiva de la proteína activa.

Lista de secuencias

50 <110> HANWHA CHEMICAL CORPORATION

<120> Método para preparar la forma activa de la proteína de fusión TNRF-Fc

<130> OPA12083PCT

<150> KR 10-2011-0081854
 <151> 17-08-2011

5 <160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

10 <211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> proteína TNFRII-Fc

<400> 1

```

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

20

ES 2 651 483 T3

210						215						220					
Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
225					230					235					240		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly		
				245					250					255			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
			260					265					270				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
		275					280					285					
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
	290					295					300						
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
305					310					315					320		
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
				325					330					335			
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
			340					345					350				
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
		355					360					365					
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
	370					375					380						
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu		
385					390					395					400		
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro		
				405					410					415			
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
			420					425					430				
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
		435					440					445					
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
	450					455					460						

Pro Gly Lys
465

<210> 2

<211> 1401

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína TNFRII-Fc

10

<400> 2

ctgacctgccc aggtggcctt cacccttac gccctgagc ctggctccac ctgccggctg

60

ES 2 651 483 T3

cgggagtact acgaccagac cgcccagatg tgctgctcca agtgctcccc tggccagcac 120
 gccaaaggtgt tctgcaccaa gacctccgac accgtgtgcg acagctgcga ggactccacc 180
 tacaccacgc tgtggaactg ggtgcccgag tgctgtcct gcggctcccg gtgctcctcc 240
 gaccaggtgg agaccaggc ctgcaccgag gagcagaacc ggatctgcac ctgcaggcct 300
 ggctggtact gcgccctgtc caagcaggag ggctgcgggc tgtgcgcccc tctgcggaag 360
 tgccggcctg gcttggcgtg gcccaggcct ggcaccgaga ccagcgacgt ggtgtgcaag 420
 ccttgcgccc ctggcacctt ctccaacacc acctcctcca ccgacatctg ccggcctcac 480
 cagatctgca acgtggtggc catccctggc aacgcctcca tggacgccgt gtgcacctcc 540
 acctcccca cccggtctat ggcccctggc gctgtgcacc tgccctcagcc tgtgtccacc 600
 cggctccagc acaccagcc taccctgag ccctccaccg ccccttctac cagcttctctg 660
 ctgcctatgg gccctagccc tctgcccag ggctccaccg gcgacgagcc taagtctctg 720
 gacaagacct acacctgccc tcctgcccct gccctgagc tgctgggagg accttccgtg 780
 ttctgttcc ctctaagcc taaggacacc ctgatgatct cccggacccc tgaggtgacc 840
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggat cctgaggtga agttcaattg gtacgtggac 900
 ggctgtgagg tgacacaagc caagaccaag cctcgggagg agcagtataa cagcacctac 960
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggaatacaag 1020
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcccgt cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080
 ggccagcctc gcgagcctca ggtgtacacc ctgcctcct cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaag ggcttctacc cttccgacat cgccgtggag 1200
 tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccctcctgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctgta ctccaagctg accgtggaca agtcccgtg gcagcagggc 1320
 aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
 ctgtccctga gccccggcaa g 1401

<210> 3
 <211> 28
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador GS Sall-F

10 <400> 3

gtcgacatgg ccacctcagc aagttccc 28

15 <210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador GS Xbal-R

<400> 4

25 tctagattag tttttgatt ggaaaggg 28

ES 2 651 483 T3

<210> 5
 <211> 1122
 <212> ADN

5 <213> ADN de GS de Hamster

<400> 5

```

atggccacct cagcaagttc ccacttgaac aaaaacatca agcaaatgta cttgtgcctg      60
ccccagggtg agaaagtcca agccatgtat atctgggttg atggtactgg agaaggactg      120
cgctgcaaaa ccgcaccctt ggactgtgag cccaagtgtg tagaagagtt acctgagtgg      180
aattttgatg gctctagtag ctttcagtct gagggtcca acagtgacat gtatctcagc      240
cctgttgcca tgtttcggga ccccttccgc agagatccca acaagctggt gttctgtgaa      300
gttttcaagt acaaccggaa gcctgcagag accaatttaa ggcactcgtg taaacggata      360
atggacatgg tgagcaacca gcacccttgg tttggaatgg aacaggagta tactctgatg      420
ggaacagatg ggcacccttt tgggtggcct tccaatggct ttctctggcc ccaaggtccg      480
tattactgtg gtgtgggctc agacaaagcc tatggcaggg atatcgtgga ggctcactac      540
cgcgccctgt tgtatgctgg ggtcaagatt acaggaacaa atgctgaggt catgcctgcc      600
cagtgggaat tccaaatagg accctgtgaa ggaatccgca tgggagatca tctctgggtg      660
gcccgtttca tcttgcacag agtatgtgaa gactttgggg taatagcaac ctttgacccc      720
aagcccattc ctgggaactg gaatggtgca ggctgccata ccaactttag caccaaggcc      780
atgcgggagg agaatggtct gaagcacatc gaggaggcca tcgagaaact aagcaagcgg      840
cacgggtacc acattcagag ctacgatccc aaggggggcc tggacaatgc ccgtcgtctg      900
actgggttcc acgaaacgtc caacatcaac gacttttctg ctggtgtcgc caatcgcagt      960
gccagcatcc gcattccccg gactgtcggc caggagaaga aaggttactt tgaagaccgc     1020
cgcccctctg ccaattgtga cccctttgca gtgacagaag ccatcgtccg cacatgcctt     1080
ctcaatgaga ctggcgacga gcccttccaa taaaaaact aa                               1122
  
```

10

<210> 6
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> proteína de GS de Hamster

15

<400> 6

```

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Asn Ile Lys Gln Met
  1             5             10             15
  
```

ES 2 651 483 T3

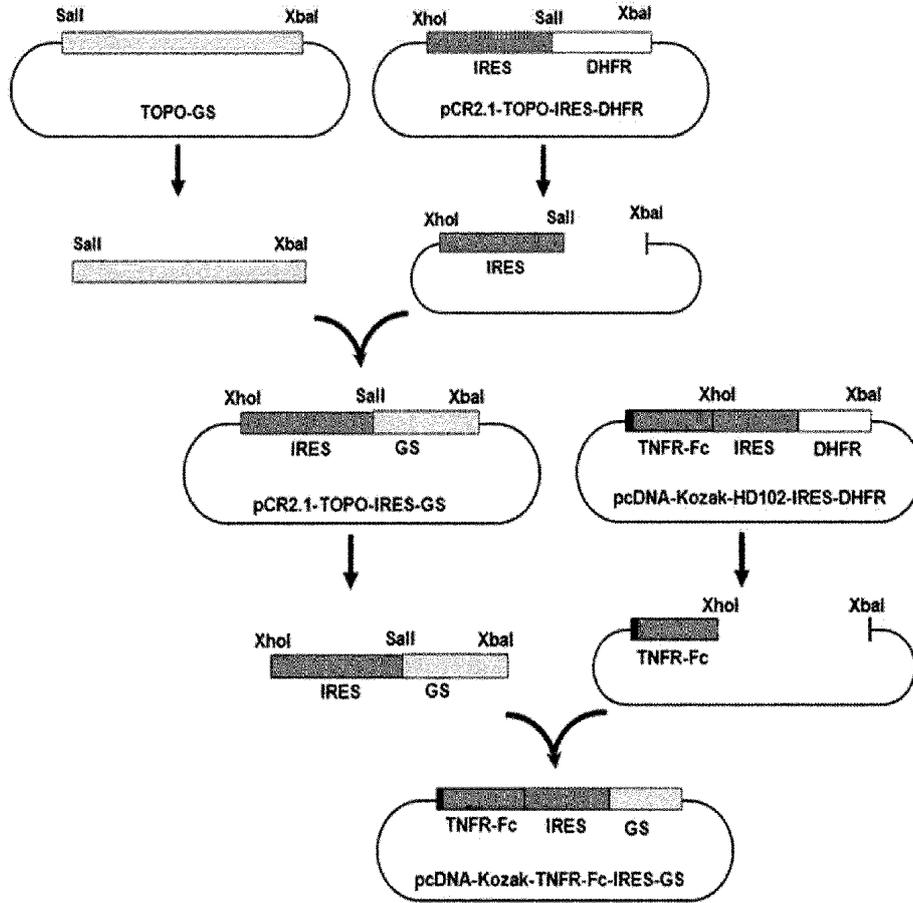
Tyr Leu Cys Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30
 Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45
 Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
 50 55 60
 Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Ser
 65 70 75 80
 Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Arg Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110
 Leu Arg His Ser Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125
 Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140
 His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
 165 170 175
 Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly
 180 185 190
 Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
 195 200 205
 Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
 210 215 220
 Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
 245 250 255
 Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys His Ile Glu Glu
 260 265 270
 Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Arg Tyr His Ile Arg Ala Tyr
 275 280 285
 Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
 290 295 300
 Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser
 305 310 315 320
 Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
 325 330 335
 Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ala Val Thr
 340 345 350
 Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
 355 360 365
 Phe Gln Tyr Lys Asn
 370

REIVINDICACIONES

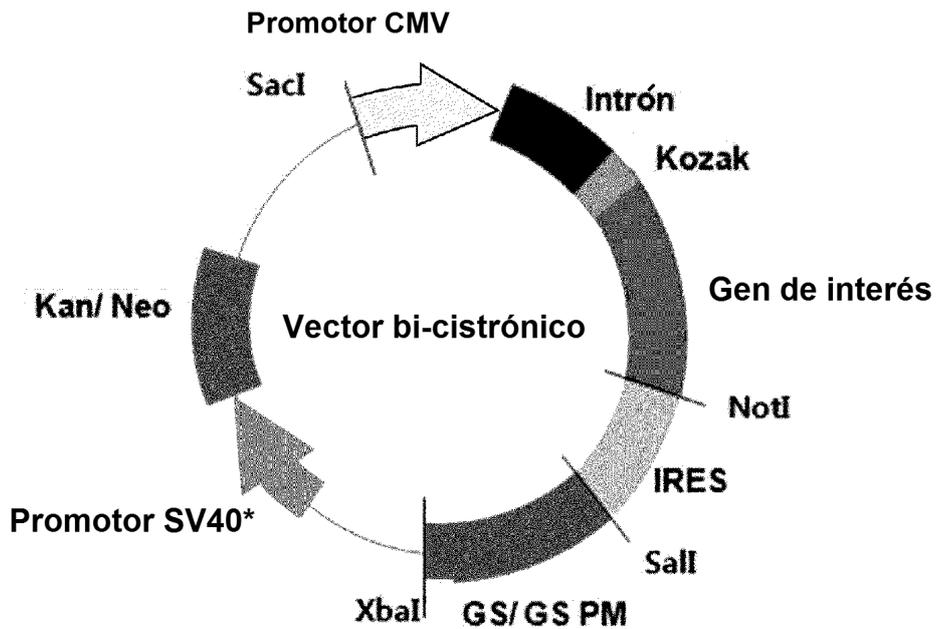
1. Un método para preparar una proteína activa de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) - Fc, que comprende:
- 5 a) cargar una muestra que comprende una mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc producidas en células de mamífero en una cantidad de 10 a 14 g/L de lecho por volumen de resina de cromatografía, a una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) preequilibrada con un tampón de equilibrado que comprende una o más sales elegidas entre el grupo que consiste en citrato sódico, sulfato sódico y fosfato sódico;
- 10 b) lavar la columna con un tampón de lavado que comprende la misma sal que en el tampón de equilibrado para eliminar las formas recortadas de la proteína de fusión TNFR-Fc de la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc; y
- c) eluir de la columna las proteínas de fusión TNFR-Fc activas con un tampón de elución que tiene una concentración salina menor que el tampón de equilibrado,
- en donde la muestra que comprende la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc se ajusta para que tenga una conductividad de 50 a 75 mS/cm, antes de la carga.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de equilibrado de la etapa a) es
- (a) un tampón que comprende citrato sódico 0,45 a 0,55 M y fosfato sódico 50 a 100 mM; o
- (b) un tampón que comprende sulfato sódico 0,70 a 0,72 M y fosfato sódico 50 a 100 mM.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el tampón de equilibrado tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 6,5 a 7,0.
- 20 4. El método según la reivindicación 2, en el que el tampón de equilibrado de la etapa a) es
- (a) un tampón que comprende citrato sódico 0,48 a 0,52 M y fosfato sódico 50 a 70 mM a un pH de 6,7 a 6,9; o
- (b) un tampón que comprende sulfato sódico de 0,71 a 0,72 M y fosfato sódico de 50 a 70 mM a un pH de 6,7 a 6,9.
5. El método según la reivindicación 1, en el que
- 25 (a) un ligando de la columna se elige entre el grupo que consiste en un grupo butilo, un grupo octilo, un grupo fenilo y un grupo alquilo:
- (b) la proteína de fusión TNFR-Fc de la etapa a) se produce en células de mamífero introducidas con un vector pcDNA3.1-Kozak-TNFR-II-Fc-IRES-GS; o
- 30 (c) la proteína de fusión TNFR-Fc es purificada parcialmente por uno o más métodos elegidos entre el grupo que consiste en cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y desalación, antes de cargarla en la columna.
6. El método según la reivindicación 1, en el que la conductividad se ajusta con una o más sales elegidas entre el grupo que consiste en citrato sódico, sulfato sódico y sulfato amónico.
- 35 7. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra que comprende la mezcla de proteínas de fusión TNFR-Fc se ajusta con citrato sódico para tener una conductividad de 50 a 55 mS/cm antes de la carga, o se ajusta con sulfato sódico para tener una conductividad de 65 a 75 mS/cm antes de la carga.
8. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de lavado de la etapa b) tiene la misma composición que en el tampón de equilibrado de la etapa a).
9. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa c) es para eluir la proteína de fusión TNFR-Fc activa con un tampón de elución que tiene una conductividad de 40 a 47 mS/cm.
- 40 10. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de elución de la etapa c) es
- (a) un tampón que comprende citrato sódico que está en el intervalo de 0,35 a 0,4 M; o
- (b) un tampón que comprende sulfato sódico que está en el intervalo de 0,35 a 0,56 M.
- 45 11. El método según las reivindicaciones 9 o 10, en el que el tampón de elución tiene un pH que está en el intervalo de 6,5 a 7,0.

12. El método según la reivindicación 10, en el que el tampón de elución de la etapa c) es
- (a) un tampón que comprende citrato sódico 0,38 a 0,4 M y fosfato sódico 50 a 70 mM a pH 6,7 a 6,9; o
 - (b) un tampón que comprende sulfato sódico 0,38 a 0,4 M y fosfato sódico 50 a 70 mM a pH 6,7 a 6,9.
- 5 13. El método según la reivindicación 1, que comprende además d) separar de la columna una fracción que comprende proteínas de fusión TNFR-Fc inactivas o agregados de proteína de fusión TNFR-Fc con un tampón que tiene pH 6,5 a 7,0 y una conductividad de 4 a 6 mS/cm .
14. El método según la reivindicación 13, en el que el tampón usado en la etapa d) comprende fosfato de 50 a 70 mM a un pH de 6,7 a 6,9.

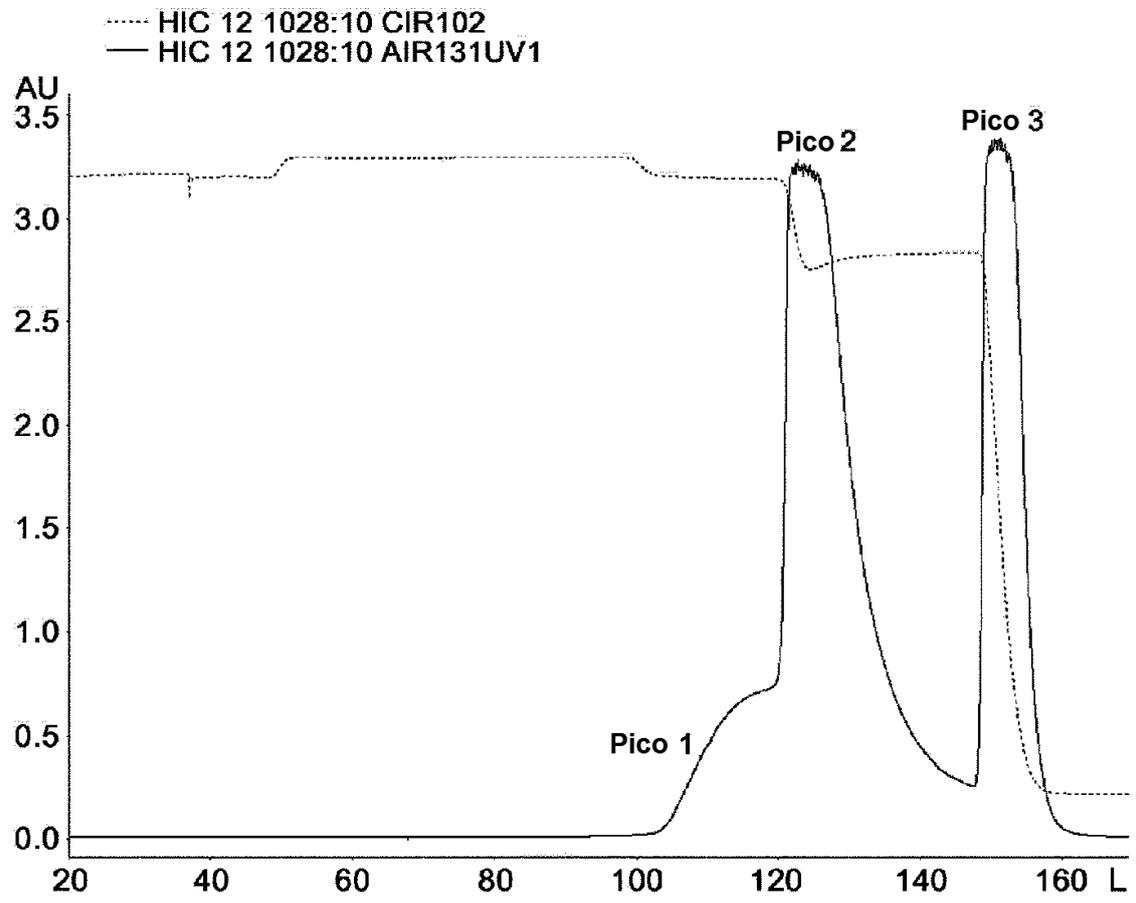
[Fig. 1]



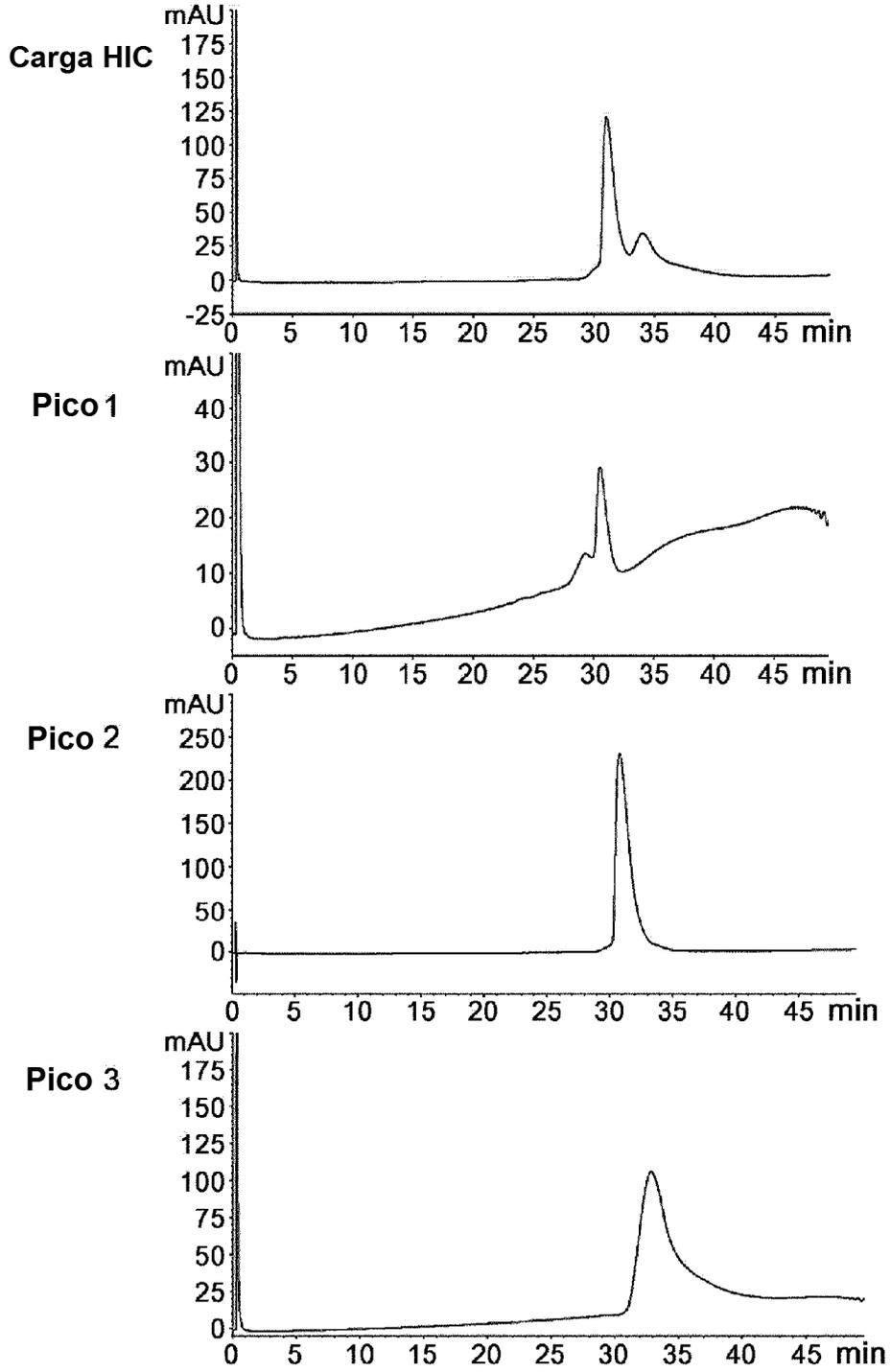
[Fig. 2]



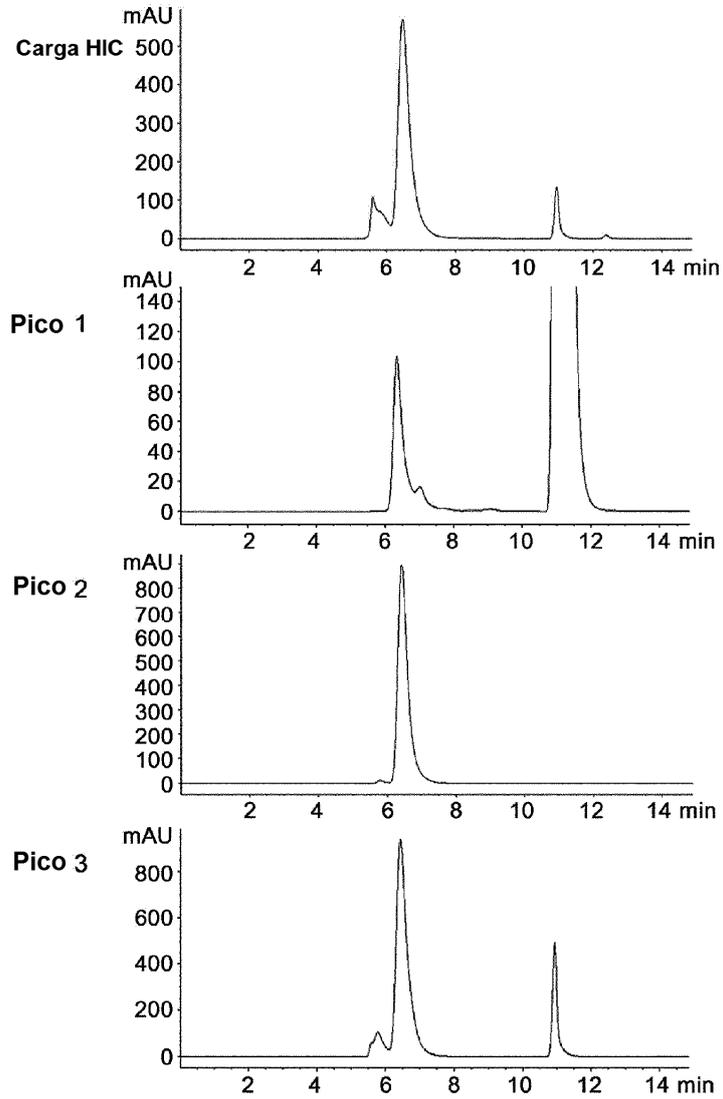
[Fig. 3]



[Fig. 6]

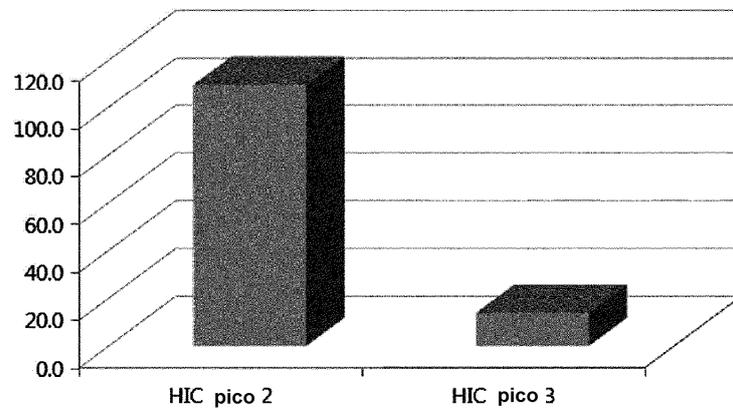


[Fig. 7]

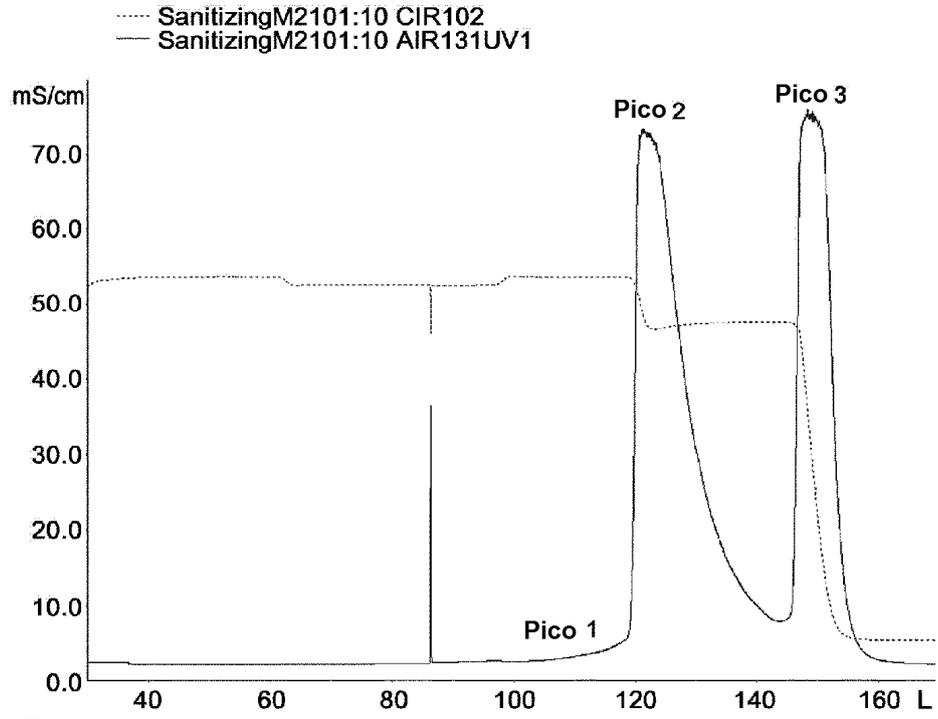


[Fig. 8]

Actividad biológica in vitro



[Fig. 9]



[Fig. 10]

