(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 377**

(51) Int. CI.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013 PCT/US2013/058994**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14043103**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013 E 13838016 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2895188**

(54) Título: **Etanercept plegado correctamente con alta pureza y excelente rendimiento**

(30) Prioridad:

11.09.2012 US 201261699552 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

(73) Titular/es:

COHERUS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
201 Redwood Shores Parkway Suite 200
Redwood City, CA 94065, US

(72) Inventor/es:

ARAKAWA, TSUTOMU y
FARRAR, DOUGLAS

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

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

Etanercept plegado correctamente con alta pureza y excelente rendimiento

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de cromatografía en modo mixto para purificar etanercept que puede incluir cantidades no deseadas de proteína incorrectamente plegadas y/o agregadas junto con proteína correctamente plegada. El método de cromatografía de modo mixto de la invención es especialmente útil para separar etanercept plegado correctamente de etanercept plegado incorrectamente (como se define en el presente documento).

Antecedentes de la invención

Etanercept (Enbrel®, fabricado por Immunex Corporation) es un polipéptido de fusión dimérica que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del receptor de factor de necrosis tumoral humano de 75 kilodalton (p75) ("TNFR") unido a la región de receptor Fc [fragmento, cristalizable] de la inmunoglobulina G humana ("IgG1"). Etanercept consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company, Inc.). El componente Fc de etanercept contiene el dominio pesado constante 2 (CH2), el dominio constante pesado 3 (CH3) y la región bisagra, pero no el dominio constante pesado 1 (CH1) de IgG1 humana. Un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente.

Las personas que padecen ciertos tipos de enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, y espondilitis anquilosante, tienen un sistema inmune que produce el factor de necrosis tumoral ("TNF"). La administración de etanercept se ha encontrado eficaz para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias, ya que puede reducir los niveles de la forma activa de TNF en un sujeto al unirse a TNF como un receptor de señuelo.

Etanercept puede producirse de una manera conocida por tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero de ovario de hámster chino ("CHO"). Desafortunadamente, el producto que se produce por las células CHO contiene una gran cantidad de etanercept de forma incorrecta o mal plegado y/o agregado. Para uso farmacéutico, es deseable proporcionar etanercept que esté relativamente libre de proteínas incorrectamente plegadas y agregadas debido a que la proteína incorrectamente plegada/agregada no tendrá el mismo efecto terapéutico que la proteína correctamente plegada y en realidad puede ser perjudicial para el paciente.

El plegamiento incorrecto y la agregación se producen con frecuencia durante la producción de proteínas recombinantes y, por lo tanto, deben abordarse a través de procesos aguas abajo capaces de separar las proteínas correctamente plegadas de la proteína que está mal plegada o agregada. El plegamiento incorrecto reduce o elimina el efecto terapéutico de la proteína. La agregación, que generalmente se entiende que implica la asociación no covalente de dos o más homodímeros de etanercept para formar especies de muy alto peso molecular, da como resultado una pérdida similar de efecto terapéutico, y ocurre cuando las proteínas, incluyendo proteínas plegadas incorrectamente, se acumulan y se agrupan. Como se ha indicado anteriormente, estas proteínas plegadas incorrectamente y agregados de proteína no sólo son ineficaces terapéuticamente, sino que también pueden ser perjudiciales para el paciente. Por consiguiente, la capacidad de purificar un producto de expresión de proteínas que contiene etanercept de manera que etanercept correctamente plegado se separe de etanercept mal plegado y/o agregado es importante para la obtención de etanercept que proporciona el mayor grado posible de aceptabilidad farmacéutica.

La producción de proteínas mal plegadas y agregadas no es un problema específico de etanercept. Hay muchas proteínas terapéuticas para las cuales el plegamiento incorrecto puede ser un problema. Por ejemplo, el plegamiento incorrecto de proteínas que contienen disulfuro durante el re-pliegamiento de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión de *Escherichia coli* es difícil de evitar, pero se puede separar con eficacia por cromatografía de fase reversa con alta resolución. El uso de pH bajo y disolvente orgánico en cromatografía de fase reversa, sin embargo, puede desnaturalizar las proteínas y puede provocar la agregación de la proteína purificada durante la cromatografía.

Incluso cuando el plegamiento incorrecto se cree que es insignificante durante la producción de proteínas farmacéuticas, por ejemplo, en el caso de expresión secretora de mamífero, todavía pueden ocurrir la agregación y algunos plegamientos incorrectos (véase por ejemplo, Chi, E. Y., Krishna, S., Randolph, T. W. y Carpenter, J. F.,

Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation, Pharm. Res., 20, 1325-1336 (2003); Kiese, S., Pappenberger, A., Friess, W., y Mahler, H. C., Shaken, Not Stirred: Mechanical Stress Tasting of an IgG1 Antibody, J. Pharm. Sci., 97, 4347-4366 (2008)). Los investigadores han separado con éxito proteínas mal plegadas no nativas en condiciones no desnaturalizantes usando cromatografía acuosa empleando intercambio iónico ("IEC") (véase, por ejemplo, Gagnon, P. J., Antibody Aggregate Removal by Hydroxyapatite Chromatography in the Presence of Polyethylene Glycol, Immunol. Methods, 336, 222-228 (2008); Gagnon, P., Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 57-87 (1996); Shukla, A. A., y Yigzaw, Y., Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, Shukla, A., Etzel, M., y Gadam, S., eds., 179-227, CRC Press, Boca Raton (2007); Staby, A., Jacobsen, J. H., Hansen, R. G., Bruus, U. K., Jensen, I. H., Comparison of Chromatographic Ion-exchange Resins. V. Strong and Weak Cation-Exchange Resigns, J.Chromatogr. A, 1118, 168-179 (2006); Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., Low, D. J., Downstream Processing of Monoclonal Antibodies-Application of Platform Approaches, Chromatogr. B, 848, 28-39 (2007); Shihara, T., Kadoya, T. J., Accelerate Purification Process Development of Monoclonal Antibodies for Shortening Time to Clinic: Design and Case Study of Chromatography Processes, Chromatogr. A, 1176, 149-156 (2007); Fahmer, R. L., Knudsen, H. L., Basey, C. D., Galan, W., Feuerhelm, D., Vanderlaan, M., Blank, G. S., Industrial Purification of Pharmaceutical Antibodies: Development, Operation, and Validation of Chromatography Processes, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 18, 301-27 (2001); y Yigzaw, Y., Hinckley, P., Hewig, A. y Vedantham, G., Ion Exchange Chromatography of Proteins and Clearance of Aggregates, Curr. Pharm. Biotech., 10, 421-426 (2009)), interacción hidrófoba ("HIC") (véase, por ejemplo, Chen, J., Tetrault, J., Ley, A., Comparison of Standard and New Generation Hydrophobic Interaction Chromatography. Resins in the Monoclonal Antibody Purification Prowess, J. Chromatogr. A., 1177, 272-81 (2008); Gagnon, P., y Grund, E., Large Scale Process Development for Hydrophobic Interaction Chromatography, Parte 4: Controlling Selectivity, BioPharm, 9, 54-64 (1996); y Lu, Y., Williamson, B., y Gillespie, R., Recent Advancement in Application of Hydrophobic Interaction Chromatography for Aggregate Removal in Industrial Purification Process, Curr. Pharm. Biotech., 10, 427-33 (2009)) y cromatografía de hidroxiapatita ("HA") (véase, por ejemplo, Aoyama, K., Chiba, J., Reparation of Molecular Forms of Mousse IgG and IgM Monoclonal Antibodies in High Performance Liquid Chromatography on Spherical Hydroxyapatite Beads, J. Immunol. Methods, 162, 201-210 (1993); Luellau, E., Marison, W., von Stockar, U., Ceramic Hydroxapatite: A New Tool for Separation and Analysis of IgA Monocolonal Antibodies, in Animal Cell Technology, Carondo, M., ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 265-269 (1997); Luellau, E., von Stockar, U., Vogt, S., Freitag, R., Development of a Downstream Process for the Isolation and Separation of Monoclonal Immunoglobulin A Monomer, Dimers, and Polymers from Cell Culture Supernatant, J. Chomatogr. A., 796, 165-175 (1998); Yamakawa, Y., Chiba, J., High Performance Liquid Chromatography of Mouse Monoclonal Antibodies on Spherical Hydroxyapatite Beads, J. Liquid. Chromatogr., 11, 665-681 (1998); Coppola, G., Underwood, J., Cartwright, G., Hearn, M. T., High-performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins: XCIII. Comparison of Methods for the Purification of Mouse Monoclonal Immunoglobulin M Autoantibodies, J. Chromatogr. A., 476, 269-290 (1989); Josics, D., Loster, K., Kuhl, R., Noll, F., Reusch, J., Purification of Monoclonal Antibodies by Hydroxylapatite HPLC and Size Exclusion HPLC, Biol. Chem. Hoppe-Seylars, 372, 149-156 (1991); Gagnon, P., y Beam, K., Antibody Aggregate Removal by Hydroxyapatite Chromatography, Curr. Pharm. Biotech. (2008)).

El documento WO2011/015926 se refiere al uso de procedimientos de fermentación y cromatográficos por separado y conjuntamente para la producción del receptor Alfa del factor de necrosis tumoral (TNFR) soluble recombinante - proteína de fusión Fc de IgG humana, en forma biológicamente activa, a partir de fluidos.

Las enseñanzas anteriores tales como a las se hace referencia anteriormente no han demostrado ser útiles para su aplicación a la separación de etanercept correctamente plegado de etanercept incorrectamente plegado ya que no logran proporcionar muestras adecuadas cualitativa y/o cuantitativamente. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de una técnica de separación eficaz y eficiente para su uso con etanercept que produce células CHO capaz de proporcionar preparaciones etanercept de muy alta pureza (es decir, en las que etanercept plegado incorrectamente está ausente o presente en la actualidad en niveles muy bajos) y con rendimientos de producción comercialmente atractivos.

La presente invención emplea la denominada cromatografía de "modo mixto". Un método de cromatografía para purificar las proteínas expresadas por vía recombinante generalmente puede denominarse "modo mixto" cuando utiliza al menos dos diferentes fuerzas para unir las proteínas y separar un producto de proteína deseada de materiales indeseados que pueden estar presentes en un producto de expresión relativamente impuro que contiene la proteína deseada junto con las impurezas indeseadas. Estas fuerzas pueden incluir, por ejemplo, las fuerzas electrostáticas y fuerzas hidrófobas.

La cromatografía de modo mixto funciona de manera similar a las técnicas más tradicionales de cromatografía ya

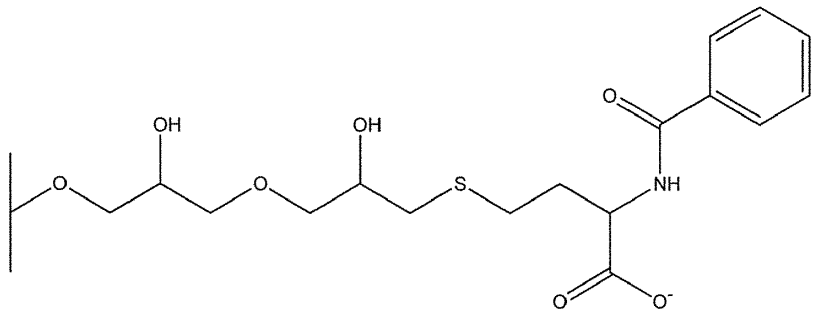
que hay una fase estacionaria y una fase móvil. Normalmente la fase estacionaria es una resina insoluble o gel, normalmente denominada como la resina de cromatografía, que proporciona la base para la separación. La resina está contenida en una columna que permite que los líquidos pasen a través y entren en contacto con la resina. La capacidad de la resina de cromatografía para separar el material deseado de material no deseado se hace posible por la presencia de grupos químicos seleccionados, o restos, que se conjugan con la resina. Estos grupos conjugados, típicamente llamados ligandos, dan a la resina las propiedades de afinidad necesarias (es decir, propiedades de atracción electrostática resultante de restos de intercambio iónico presentes en los ligandos, y propiedades de atracción hidrófoba resultantes de restos hidrófobos presentes en los ligandos), permitiendo así que la resina se una en algunos de los materiales de proteína en una muestra impura, pero otros no, cuando una solución que contiene la muestra impura se deja fluir a través de la columna de cromatografía en contacto con la resina.

La fase estacionaria de la columna de cromatografía que contiene la resina con estos grupos de afinidad se empaqueta dentro de la columna de cromatografía que típicamente es un recipiente cilíndrico rígido en el que el fluido puede ser introducido en un extremo, contactar con la resina, y después salir de la columna en un extremo opuesto. Una solución que contiene la proteína a purificar puede introducirse (y así permitir que fluya) en la columna colocando el producto de proteína en una solución apropiada y permitiendo que la solución, denominada la fase móvil, transcurra a través de la columna. Cuando el producto de la proteína a purificar (denominado analito) se presenta a la columna en la fase móvil, alcanza un estado de equilibrio entre la columna y la fase móvil, lo que significa que parte del material en la solución de proteína se fije, se una o llegue a fijarse a o se capture por los grupos de afinidad en la resina de la columna, mientras que el resto del material en el producto no se unirá a la columna, pero en cambio, fluirá a través y fuera de la columna donde se puede recoger para su análisis, procesamiento posterior, o puede ser desechado.

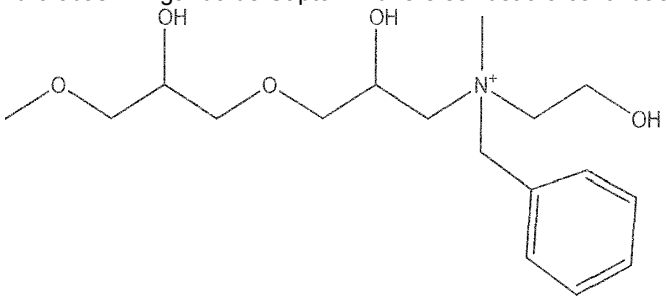
Una vez que un analito de proteína se ha unido a la columna de la manera descrita anteriormente, se usa entonces etapa de lavado - típicamente denominada una etapa de elución - para eluir, o liberar, el analito unido de la columna. Dependiendo del tipo de ligandos de afinidad (por ejemplo, restos basados en la carga o restos hidrófobos, o una combinación de los mismos, etc.), que están presentes en la resina para unir el analito a la columna, la solución usada para la elución o liberación del analito de la columna debe tener una afinidad o una atracción hacia el analito y/o el ligando (propiedades de carga ejemplares, propiedades hidrófobas, propiedades de pH, concentración de sal, etc.) que puede superar la afinidad del analito, o atracción, a la resina, haciendo de esta manera que el analito sea liberado de la resina (la fase estacionaria a la que se hace referencia anteriormente) y en el medio de elución (la fase móvil). Una vez liberado o eluido en la fase móvil, el analito puede entonces fluir a través y fuera de la columna de cromatografía para la recogida eventual, análisis, etc., o la transferencia a métodos de purificación o etapas de filtración adicionales. Puede entenderse que independientemente de las propiedades de atracción, o afinidad, que hacen que un analito se una a la resina de cromatografía (por ejemplo, propiedades de carga o propiedades hidrófobas), la solución de fase móvil que se usa posteriormente para eluir o liberar el analito debe tener un conjunto de competencia de propiedades de tal forma que el analito "prefiera" entonces estar en el medio de elución en lugar de permanecer capturado en la resina de la columna.

En comparación con otras técnicas de cromatografía de modo sencillo, la denominada cromatografía de modo mixto es única, ya que los diversos factores de unión y elución pueden ser interdependientes y pueden oponerse a otro. Por ejemplo, el aumento de la fuerza iónica de la fase móvil en la cromatografía de intercambio iónico tradicional en modo sencillo puede impulsar la elución o liberación de analito unido a la resina cuando las características cargadas de un analito tienen una atracción más fuerte (preferencia) por el medio de elución frente a las fuerzas de atracción de la resina de la columna. Sin embargo, en un método de cromatografía de modo mixto donde la resina de cromatografía usa tanto la atracción electrostática como la atracción hidrófoba para unir un analito, el aumento de la fuerza iónica de la fase móvil (elución) puede impulsar la liberación de material de muestra de la columna basada en propiedades de la carga de ese material, impulsando al mismo tiempo o reforzando la unión de materiales hidrófobos en el analito debido a que dichos materiales de proteína hidrófoba - en presencia de medio de elución basado en la carga - tenderán entonces a tener una atracción o preferencia más fuerte a unirse a los ligandos hidrófobos de la columna frente al entorno cargado del medio de elución. Por consiguiente, mientras que un aumento en la concentración de sal puede conducir de hecho a una tendencia a desplazar los materiales de proteína cargados de la fase estacionaria cuando los iones cargados en la fase móvil compiten con la proteína por los sitios de unión en la fase estacionaria - aquellas porciones de una mezcla de producto de analito que pueden presentar un carácter hidrófobo de grado superior pueden tener una mayor tendencia a permanecer unidas a los restos hidrófobos de la columna de cromatografía de modo mixto. La capacidad de aprovechar estos fenómenos en cualquier contexto de separación de proteína determinado puede considerarse difícilmente predecible.

Dos ejemplos de resinas de modo mixto son Capto™ MMC y Capto™ Adhere (disponibles en GE Healthcare). Capto™ MMC utiliza un ligando unido a una matriz de soporte sólido que puede interactuar con el analito por intercambio catiónico (con su grupo carboxílico), unión de hidrógeno, e interacciones hidrófobas. El ligando de Capto™ MMC se ilustra a continuación:



Capto™ Adhere es similar a Capto™ MMC, ya que también emplea un ligando que se une a una matriz de soporte sólido. El ligando, N-bencil-N-metil etanol amina, también interactúa con el analito por intercambio de anión, unión de hidrógeno, e interacciones hidrófobas. El ligando de Capto™ Adhere se ilustra a continuación:



En ambos ligandos, se espera que la interacción hidrófoba sea débil. Por lo tanto, si estos ligandos tienen sólo restos hidrófobos (sin cargas), más probablemente pueden requerir de condiciones de eliminación de sal (precipitación de la proteína) para la unión de proteínas. Sin embargo, el tener interacción electrostática puede hacer que dicha interacción hidrófoba débil sea suficiente para proporcionar fuerza de unión adicional.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que puede emplearse cromatografía de modo mixto, por ejemplo, usando Capto™ MMC y Capto™ Adhere como la resina de cromatografía de modo mixto, para purificar un analito que comprende etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado, por lo que etanercept correctamente plegado puede separarse del etanercept incorrectamente plegado de una manera altamente eficiente, y con los rendimientos de producción excelentes, para obtener una preparación de proteína que está altamente enriquecida en el etanercept deseado, correctamente plegado. Además, la invención incluye la capacidad de poner en práctica la separación cromatográfica de modo mixto que se describe en el presente documento de tal manera que se obtenga un producto de elución de la separación cromatográfica que puede, si se desea, estar libre o esencialmente libre del producto incorrectamente plegado, aunque puede entenderse para los fines de rendimiento en equilibrio y pureza, que se puede encontrar esto aceptable para incluir niveles muy bajos del producto incorrectamente plegado (por ejemplo, menos del 5% en peso y preferiblemente menos del 3% en peso) con el fin de maximizar los rendimientos a un punto deseado.

Por consiguiente, en una primera realización, la presente invención es un método de cromatografía de modo mixto para separar una proteína correctamente plegada de una proteína mal plegada, que comprende las etapas de: (a) unir una primera mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende tanto conformaciones correctamente plegadas como incorrectamente plegadas de etanercept a una resina de cromatografía de modo mixto que tanto restos de intercambio iónico como restos hidrófobos; (b) eluir etanercept correctamente plegado de la resina de modo mixto para obtener una segunda mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende una mayor proporción de etanercept correctamente plegado que la primera mezcla que contiene etanercept. La expresión "mayor proporción" significa que la relación de etanercept correctamente plegado con respecto a incorrectamente plegado el eluato de la etapa (b) es al menos mayor de 1:1, pero mucho más preferiblemente mayor de

aproximadamente 8:2, y preferiblemente mayor de aproximadamente 9:1. La segunda mezcla de proteínas contiene más preferiblemente etanercept correctamente plegado en una cantidad que constituye al menos aproximadamente el 95% en peso de la segunda mezcla de proteínas.

Las realizaciones del método descrito anteriormente proporcionan una mezcla de proteínas que comprende etanercept correctamente plegado en una cantidad que constituye más de aproximadamente el 90% en peso de la mezcla de proteínas; y que comprende etanercept incorrectamente plegado en una cantidad que constituye menos de aproximadamente el 5% en peso de la mezcla de proteínas; y en el que la mezcla de proteínas tiene una cantidad combinada de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado que constituye al menos aproximadamente el 95 y preferiblemente al menos aproximadamente el 98% en peso de la mezcla de proteínas que contiene etanercept. Las cantidades de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado pueden determinarse mediante cromatografía de interacción hidrófoba (modo sencillo). La cantidad combinada de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado puede determinarse usando cromatografía por exclusión de tamaño ("SEC"). Como se usa en el presente documento, las expresiones "mezcla de proteínas a base de etanercept" o "mezcla de proteínas que contiene etanercept" o "preparación de etanercept" o "material a base de etanercept", deben leerse como sinónimos y sirven para representar una mezcla de proteínas en la que el componente principal comprende etanercept correctamente plegado y los componentes secundarios pueden comprender etanercept incompleto, etanercept incorrectamente plegado, etanercept agregado (estando dichos agregados compuestos por etanercept correctamente y/o incorrectamente plegado), o fragmentos de etanercept. La presente invención proporciona la capacidad de producir una mezcla de proteínas a base de etanercept (o preparación de etanercept) para su uso como el principio activo en formulaciones farmacéuticas en las que se desea maximizar la cantidad de etanercept correctamente plegado, mientras se minimiza la cantidad de etanercept incorrectamente plegado (incluyendo agregado), en mayor medida que la conseguida hasta ahora.

Puede usarse etanercept altamente puro de acuerdo con el método de la invención en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para su administración a un sujeto que requiere tratamiento para una afección mediada por TNF, conteniendo dicha formulación una mezcla de proteínas que comprende una importante cantidad de etanercept correctamente plegado y una cantidad menor de etanercept incorrectamente plegado, en la que: (i) el etanercept incorrectamente plegado constituye menos de aproximadamente el 10% en peso, preferiblemente menos de aproximadamente el 8% en peso, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso de la mezcla de proteínas; (ii) el etanercept correctamente plegado constituye más del 90% en peso y preferiblemente más de aproximadamente el 92% en peso, y mucho más preferiblemente más de aproximadamente el 95% en peso de la mezcla de proteínas; y (iii) la cantidad total de etanercept correctamente plegado y etanercept incorrectamente plegado (pero sin incluir agregados del mismo) constituye al menos el 95% en peso y preferiblemente al menos el 98% en peso de la mezcla de proteínas; en la que la formulación comprende además principios inactivos, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables que hacen que la formulación sea adecuada para su administración al sujeto.

En una realización adicional, la invención es un método para producir una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una pureza elevada con respecto a la cantidad de etanercept correctamente plegado frente a incorrectamente plegado presente en la misma, comprendiendo dicho método las etapas de: (1) expresar etanercept en un sistema de expresión mamífero para obtener un fluido de cultivo celular recolectado que contiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende tanto etanercept correctamente plegado como incorrectamente plegado; (2) someter el fluido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1 a un proceso de purificación, por lo que se obtiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una cantidad reducida, o sustancialmente libre, de impurezas no deseadas (es decir, proteínas no basadas en etanercept) presentes en el fluido de cultivo celular recolectado producido en la etapa (1); (3) poner en contacto la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida en la etapa (2) una o más veces con una resina cromatográfica en modo mixto que tiene tanto restos de intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba con el fin de fijar las proteínas contenidas en la mezcla a la resina; y (4) poner en contacto la resina de modo mixto que tiene una proteína unida a la misma de la etapa 3, con una solución capaz de eluir etanercept correctamente plegado en la resina en modo mixto para obtener un eluato que comprende una mezcla de proteínas que contiene etanercept que tiene una mayor proporción de etanercept correctamente plegado frente a etanercept plegado incorrectamente que la mezcla que contiene etanercept introducida a la resina en la etapa 3; y en el que (i) la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida a partir de la purificación de la etapa 2 es al menos aproximadamente 80% en peso, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 85% en peso de la cantidad de la mezcla de proteínas a base de etanercept presente en el fluido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1; (ii) la cantidad combinada de proteína de etanercept incorrectamente y correctamente plegado presente en la mezcla de proteína eluida en la etapa 4 es al menos aproximadamente el 60% en peso de la cantidad

de la misma presente en la mezcla de proteína obtenida de la etapa 2; (iii) la cantidad de etanercept correctamente plegado presente en el eluato de la etapa 4 es al menos de aproximadamente el 30% en peso y preferiblemente al menos de aproximadamente el 34% en peso de la cantidad de la mezcla de proteínas que contiene etanercept presente en el fluido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1; y (iv) dicho etanercept correctamente plegado constituye al menos aproximadamente el 90% en peso, y preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso del eluido obtenido en la etapa 4.

También se describe un método para separar etanercept correctamente plegado de etanercept incorrectamente plegado, en el que se usan medios cromatográficos para lograr dicha separación, y en el que los medios cromatográficos consisten exclusivamente en cromatografía en modo mixto en la que una mezcla que comprende etanercept correctamente plegado y etanercept plegado incorrectamente se pone en contacto con una resina cromatográfica de modo mixto que tiene intercambio iónico y restos hidrófobos, y entonces se eluye en la misma, para obtener un eluato que comprende al menos aproximadamente el 85 y preferiblemente al menos aproximadamente el 90, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso de etanercept correctamente plegado. Con respecto a este método, cuando se indica en el presente documento que los "medios cromatográficos consisten exclusivamente en cromatografía mixta", debe entenderse que dicha fraseología no excluye el uso opcional de diversos medios de cromatografía (por ejemplo, HIC, SEC, etc.) cuando se usa exclusivamente con fines analíticos. Este método es ventajoso ya que no requiere el uso de metodologías de separación para resolver correctamente la proteína mal plegada aparte de la metodología en modo mixto que se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, los métodos descritos anteriormente como aplicados a etanercept pueden ponerse en práctica dos o más veces para obtener una preparación altamente pura de etanercept de la siguiente manera: realizando una primera separación en modo mixto (separación n.º 1) llevando a cabo las etapas (a) y (b) como se ha descrito, por ejemplo, en las realizaciones 1 y 2 anteriores; seguido de la realización de una segunda separación en modo mixto (separación n.º 2) llevando a cabo las etapas (a) y (b) de nuevo; donde el eluato obtenido en la etapa (b) de la separación n.º 1 se usa entonces como el analito (es decir, la solución que contiene una mezcla de proteínas) para la etapa (a) de la separación n.º 2. Las resinas en modo mixto usadas en la separación n.º 1 y la separación n.º 2 pueden ser las mismas o diferentes. En una práctica particularmente preferida de este aspecto, la separación n.º 1 se realiza con la resina de modo mixto CAPTO MMC, y la separación n.º 2 se realiza con la resina de modo mixto CAPTO ADHERE.

Opcionalmente, las preparaciones de etanercept resultantes del método de la invención pueden, si así se desea, estar libres o esencialmente libres de etanercept incorrectamente plegado, aunque puede entenderse que la capacidad en el presente documento para proporcionar preparaciones de etanercept con niveles notablemente bajos de etanercept plegado incorrectamente, preferiblemente menos de aproximadamente el 10% en peso y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso de la cantidad total de una mezcla de proteínas a base de etanercept presente en una formulación farmacológica, representa un avance significativo sobre formulaciones farmacéuticas actualmente disponibles para la venta comercial que contienen mezclas a base de etanercept en las que la cantidad de etanercept incorrectamente plegado en dichas mezclas, basado en el análisis HIC, puede ser mayor de aproximadamente el 10% de las proteínas a base de etanercept encontradas en dichas formulaciones.

Las resinas de modo mixto preferidas para su uso en la invención son CAPTO MMC y CAPTO ADHERE; sin embargo, debe entenderse que cualquier resina de modo mixto funcionalizada con los restos de intercambio iónico y restos hidrófobos se contempla para su uso en la presente invención.

Sin desear quedar limitado a ninguna teoría particular, se considera posible, sino absolutamente predecible, que se puede aprovechar la interdependencia y acción opuesta entre las características de carga y las características hidrófobas en una cromatografía en modo mixto que emplea estos dos tipos de afinidad, con el fin de desarrollar una separación altamente eficiente de especies de proteínas correctamente plegadas de especies que están incorrectamente plegadas y/o agregadas. Sorprendentemente, el método de modo mixto de la invención no necesita combinarse o complementarse con ninguna otra estrategia de separación para resolver la proteína plegada correctamente de la proteína incorrectamente plegada con excelente rendimiento y alta pureza. Por ejemplo, no es necesario emplear una etapa adicional de HIC a fin de lograr adicionalmente dicha separación de la proteína plegada correctamente de la proteína mal plegada.

Según se aplica a etanercept, el método de cromatografía de modo mixto de acuerdo con la presente invención consiste en la aparición de la siguiente secuencia general de fenómenos: En primer lugar, tras la introducción de una muestra que contiene etanercept impuro a la resina de modo mixto (es decir, una muestra que comprende

impurezas correctamente plegadas, incorrectamente plegadas, y otras impurezas) tal como las obtenidas, por ejemplo, a partir de la expresión de CHO de etanercept, el método de la invención permite que etanercept (tanto correcta como incorrectamente plegado) se una a la resina de modo mixto. En segundo lugar, durante una posterior elución o etapa de lavado (por ejemplo, utilizando un gradiente de sal aplicado preferiblemente en un gradiente de concentración creciente), la presente invención permite la liberación (es decir, elución) de la resina de una mezcla a base de etanercept en la que el etanercept contenido en la misma predominante se pliega correctamente, mientras permite substancialmente que etanercept sea plegado incorrectamente para permanecer unido o capturado en la resina de modo mixto; por lo que se puede obtener en el material eluido de la resina en una proporción muy elevada del etanercept correctamente plegado (en comparación con una menor proporción del mismo presente en la muestra de proteínas que contiene etanercept inicialmente introducida y unida a la resina). En cuanto al funcionamiento físico de la cromatografía de modo mixto de la presente invención, la resina de modo mixto puede contenerse (es decir, empaquetarse) en un medio de contención rígido columnar o recipiente que puede contener la resina, y que tiene medios de entrada y salida para permitir que las soluciones fluidas entren en un extremo de la columna, fluyan en contacto con la resina, y luego salgan por un extremo opuesto del recipiente para recogerse para su posterior análisis o procesamiento, o que se desechen.

La solución que contiene una mezcla de proteínas de etanercept correctamente plegado y plegado incorrectamente utilizado en la etapa (a) de los métodos descritos anteriormente puede obtenerse de una manera conocida a partir de la expresión de la proteína etanercept en el cultivo de células de mamífero, por ejemplo, células CHO. Antes de la purificación cromatográfica de modo mixto en la presente invención, la proteína recolectada de la expresión mamífera (un fluido de cultivo celular recolectado) puede someterse a una etapa de purificación inicial, tal como la purificación por afinidad de proteína A, para eliminar las impurezas. Mientras que dicha etapa puede ser deseable para la eliminación de impurezas no basadas en etanercept, esta purificación generalmente no dará como resultado una separación apreciable (es decir, resolución) del etanercept correctamente plegado del etanercept incorrectamente plegado. Por consiguiente, el grupo de proteína A se somete entonces a la metodología de modo mixto de la presente invención para realizar dicha separación.

El método de la presente invención ofrece recuperaciones comercialmente útiles (rendimientos) de etanercept correctamente plegado. Por ejemplo, en casos en los que la solución de proteína a base de etanercept de etanercept correctamente plegado y plegado incorrectamente utilizado en la etapa (a) del presente método se proporciona preferiblemente en forma de un resultado de cromatografía de proteína A obtenido purificando un producto de expresión mamífera de etanercept en una columna de proteína A, la cantidad de material recuperado en la etapa de purificación de la proteína A es preferiblemente al menos aproximadamente del 80% en peso y preferiblemente al menos aproximadamente del 85% en peso de los productos de expresión a base de etanercept presentes en el cultivo celular recolectado introducido a la columna de la proteína A (donde la cantidad de proteínas a base de etanercept presentes en el cultivo celular recolectado puede determinarse mediante Fc Elisa, y la cantidad de proteínas a base de etanercept obtenidas en el grupo de elución de la proteína A puede determinarse por absorbancia UV a A280 nm). Posteriormente, cuando la cromatografía de modo mixto de la presente invención se pone en práctica usando el material purificado de proteína A mencionado anteriormente, la cantidad de material de proteína a base de etanercept obtenido en la elución de la etapa (b) del presente es preferiblemente al menos aproximadamente del 60% en peso y preferiblemente al menos aproximadamente del 70% en peso de la cantidad de material a base de etanercept introducido a la resina de modo mixto en la etapa (a) de la invención.

Por consiguiente, el rendimiento total de una mezcla altamente pura de etanercept en el eluato de modo mixto de la etapa (b) de la presente que está altamente enriquecido en etanercept correctamente plegado (es decir, que contiene no más del 10% en peso y preferiblemente no más de aproximadamente el 5% en peso de material plegado incorrectamente por peso del eluato) puede ser cualquiera de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50% en peso de la mezcla a base de etanercept originalmente presente en un fluido de cultivo celular recolectado antes de la purificación (por ejemplo, purificación de la proteína A) del mismo.

La purificación del fluido de cultivo celular recolectado también puede lograrse por otros medios cromatográficos, tal como cromatografía de modo mixto usando resinas de cromatografía que tienen tanto intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba.

En la práctica del método de la presente invención, las etapas de filtración adicionales (por ejemplo, filtración viral y filtración de flujo tangencial) pueden realizarse de una manera conocida para procesar además eluatos producidos en la etapa (b) del método de cromatografía de modo mixto descrito anteriormente.

La presente invención proporciona un método de separación muy mejorado para la separación de conformaciones

correctamente plegadas de conformaciones incorrectamente plegadas (incluyendo agregados) de una determinada proteína y, en particular, la resolución de etanercept correctamente plegado de etanercept mal plegado (y agregado) obtenido de una cosecha de cultivo de células de mamífero que comprende una mezcla altamente heterogénea de especies basadas en etanercept.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra la estructura química de la resina de modo mixto Capto-MMC y Capto-Adhere.

La **figura 2A** (perfil de elución de la proteína A) muestra un perfil de elución de Proteína A de cultivo recolectado de CHO que comprende tanto la proteína etanercept correctamente plegada como mal plegada usando la elución por citrato 0,1 M a un pH indicado que contienen arginina 1 M. La curva sólida es absorbancia UV; la curva punteada, es conductividad (igual que en las siguientes figuras).

La **figura 2B** (perfil de elución de la Proteína A) muestra los resultados de PAGE nativa para muestras eluidas de Proteína A en los que el Carril 1 es estándar (Enbrel comercial); el carril 2 es Carga; el carril 3 es FT (flujo pasante); el carril 4, pH 6,0; el carril 5, pH 4,2; el carril 6, pH 3,7; el carril 7, pH 3,0.

La **figura 3A** (perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto MMC) muestra un cromatograma CAPTO MMC de elución por NaCl o arginina en fosfato 10 mM, pH 7,5.

La **figura 3B** (perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto MMC) SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas) en la que Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2, FT; carril 3, NaCl 0,15 M; carril 4, NaCl 0,3 M; carril 5, arginina 1 M.

La **figura 4A** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto MMC) muestra una cromatografía de elución por gradiente de NaCl 0-0,5 M a pH 7,5. La columna se equilibró con fosfato 10 mM, pH 7,5 antes del gradiente de elución.

La **figura 4B** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto MMC) muestra PAGE nativa de las muestras eluidas en la que: Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2 a carril 8, fracciones eluidas; carril 9, arginina 1 M.

La **figura 4C** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto MMC) muestra SDS-PAGE y PAGE nativa de una muestra eluida para diferentes grupos de Proteína A en la que: Carril 0, estándar; carril 1, Carga, carril 2, FT; carril 3 a carril 8, fracciones eluidas; carril 9, arginina 1 M.

Figura 5A (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) Cromatograma de elución por gradiente de Na_2SO_4 0-0,4 M a pH 7,5. La columna se equilibró con fosfato 10 mM, pH 7,5 antes del gradiente de elución.

Figura 5B. (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas en la que; carril 1, Carril; carril 2, FT; carril 3, lavado de tampón; carril 4 a carril 9, fracciones eluidas; carril 10, arginina 1 M.

La **figura 6** muestra un análisis HIC de fracciones eluidas de Capto-MMC.

La **figura 7A** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) muestra un cromatograma de elución por pH y gradiente de sal.

La **figura 7B** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) muestra SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas en la que Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2 y 3, FT; carril 4 a carril 8, fracciones eluidas; carril 9, arginina 1 M.

La **figura 8A** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) muestra un cromatograma de elución por pH y gradiente de Na_2SO_4.

La **figura 8B** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-MMC) muestra SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas en la que Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2, FT; carril 3 a carril 5, fracciones eluidas; carril 6, arginina 1 M.

La **figura 9** muestra PAGE nativa del grupo de proteína A de Capto-Adhere en la que Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2, citrato 5 mM (pH 4,5); carril 3 y 4, arginina 0,1 M (pH 4,5); carril 5, arginina 0,5 M. Se presentan en un recuadro las especies de bajo peso molecular observadas.

La **figura 10A** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-Adhere) muestra un cromatograma de elución por pH y gradiente de arginina.

La **figura 10B** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-Adhere) muestra SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas en la que: Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2 a carril 4, FT; carril 5 a carril 7, fracciones eluidas; carril 8, arginina 0,5 M.

La **figura 11A** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-Adhere) muestra un cromatograma de elución por pH y gradiente de arginina.

La **figura 11B** (Perfil de elución del grupo de Proteína A de Capto-Adhere) muestra PAGE nativa de muestras eluidas en la que Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2, FT; carril 3 a carril 5, fracciones eluidas; carril 6, arginina 1 M.

La **figura 12** es una representación esquemática de análisis de HIC (cromatografía de interacción hidrófoba) de fracciones de elución de resina de modo mixto Capto-Adhere obtenidas en la etapa 3B del ejemplo 12 en la que la muestra de carga es el material obtenido en la etapa 3A del ejemplo 12. El porcentaje de etanercept correctamente plegado está indicado en el eje vertical, y la aplicación del gradiente de sal en el tiempo se representa en el eje horizontal. Una fracción de elución obtenida temprano en el gradiente contiene etanercept correctamente plegado al 100%.

La **figura 13** (Perfil de elución de grupo Capto-MMC de Capto-Adhere) muestra SDS y PAGE nativa de muestras eluidas. La elución se hizo con un gradiente de arginina a pH 7,5.

en la que: Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2 y 3, FT; carril 4 a carril 7, fracciones eluidas; carril 8, arginina 1 M.

La **figura 14** es un cromatograma de elución del grupo Capto-MMC de Capto-Adhere. La elución se hizo por un gradiente de NaCl a pH 7,5.

La **figura 15A** (Perfil de elución del grupo Capto-MMC de Capto-Adhere) muestra un cromatograma de elución por gradiente de sal/arginina a pH 7,5.

La **figura 15B.** (Perfil de elución del grupo Capto-MMC de Capto-Adhere) SDS-PAGE y PAGE nativa de muestras eluidas en la que: Carril 0, estándar; carril 1, Carga; carril 2, FT; carril 3 a carril 6, fracciones eluidas; carril 7, arginina 1 M.

La **figura 16** es un cromatograma HIC correspondiente al material etanercept producido en el Ejemplo 12, en la que el gráfico que no presenta esencialmente un segundo pico menor (material mal plegado) corresponde al material producido de acuerdo con la presente invención (ejemplo 12); y en la que se ve que la curva adicional en la figura correspondiente a etanercept disponible comercialmente, proporcionada para fines comparativos, presenta un segundo pico menor que representa material mal plegada y/o agregado.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento en el presente documento de que las resinas de modo mixto que usan intercambio iónico y principios de atracción hidrófoba, por ejemplo, Capto™ MMC y Capto™ Adhere, pueden usarse para unir y después preferiblemente (es decir, selectivamente) eluir conformaciones correctamente plegadas frente a conformaciones incorrectamente plegadas de etanercept. Ambas resinas de modo mixto mencionadas anteriormente comprenden ligandos con restos (es decir, grupos químicos) que proporcionan dos modos diferentes para atraer y unir etanercept, concretamente, atracción de intercambio iónico e interacción hidrófoba.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos que se usan para describir la invención se analizan a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una orientación adicional al especialista con respecto a la descripción de la invención. Se proporcionan sinónimos de ciertos términos. El uso de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte en esta memoria descriptiva, incluyendo ejemplos de cualesquiera términos analizados en el presente documento, es solamente ilustrativo únicamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. En caso de conflicto, tendrá prioridad el presente documento, incluyendo las definiciones.

"Aproximadamente" generalmente significará dentro del 20 por ciento, dentro del 10 por ciento, dentro del 5, 4, 3, 2 o 1 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas dadas son aproximadas, lo que significa que el término "aproximadamente" puede deducirse si no se indica expresamente.

El término "etanercept" como se usa en el presente documento, significa el principio activo contenido en la formulación comercial de Enbrel®, concretamente un homodímero del polipéptido de fusión que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del factor de necrosis tumoral humano de 75 kilodalton (p75) ("TNFR") unido a la porción Fc [fragmento, cristalizable] de la inmunoglobulina humana G ("IgG1"). Etanercept es un homodímero, ya que dos cadenas de TNFR 75 kilodalton:molécula Fc como se ha descrito anteriormente están conectadas por un enlace disulfuro en una región de bisagra de la porción Fc. Etanercept consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons, y el componente Fc del mismo contiene el dominio constante pesado 2 (CH2), el dominio constante pesado 3 (CH3) y región bisagra, pero no el dominio constante pesado 1 (CH1) de IgG1 humana. Para los fines de la presente solicitud, el término "etanercept" también puede

incluir etanercept con pequeñas modificaciones en la estructura del aminoácido (incluyendo deleciones, adiciones, y/o sustituciones de aminoácidos) que no afectan significativamente a la función del polipéptido como se ha descrito anteriormente. El término etanercept también debe entenderse que incluye proteínas destinadas o consideradas que son variantes denominadas bio-similares o bio-mejores de etanercept.

La expresión "etanercept correctamente plegado" como se usa en el presente documento, pretende representar una conformación de plegamiento del homodímero de etanercept (como se ha definido anteriormente) con actividad biológica para la inhibición de TNF y conformación que son iguales o sustancialmente iguales a la conformación y la actividad biológica del principio activo en Enbrel®.

La expresión "etanercept plegado incorrectamente" como se usa en el presente documento pretende incluir: (i) una proteína homodimérica que tiene la misma o esencialmente la misma secuencia de aminoácidos que etanercept (según lo definido anteriormente), pero que tiene una conformación diferente a la del etanercept correctamente plegado, en la que dicha conformación diferente hace que la proteína carezca o sustancialmente carezca de actividad biológica como un inhibidor de TNF; y/o (ii) un agregado en el que dos o más homodímeros de etanercept correctamente plegado o incorrectamente plegado se han llegado a asociar (es decir, se han agregado o aglomerado) de tal manera para formar especies que tengan mayor peso molecular que etanercept correctamente plegado; y/o (iii) una mezcla de (i) y (ii); y/o (iv) composiciones de proteínas agregadas, es decir, aglomeradas, que comprenden la misma o esencialmente la misma secuencia, o porciones de la misma, que el etanercept correctamente plegado pero que presentan una posición de elución disminuida (debido a una mayor hidrofobicidad) en una columna HIC en comparación con el etanercept correctamente plegado.

El término "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de remedios para una enfermedad en un mamífero e incluye inhibir la enfermedad, detener su desarrollo, aliviar la enfermedad, (por ejemplo, causando la regresión, o restaurando o reparando una pérdida, carencia o función defectuosa) o estimular un proceso ineficiente. El término incluye obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado y cubrir cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológico en un mamífero. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. Incluye (1) evitar que el trastorno ocurra o vuelva a ocurrir en un sujeto que puede estar predispuesto al trastorno pero aún no es sintomático, (2) inhibir el trastorno, tal como detener su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o al menos sus síntomas asociados, de manera que el huésped ya no padezca el trastorno o sus síntomas, tal como causando la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, al restaurar o reparar una pérdida, carencia o función defectuosa, o estimular un proceso infeccioso, o (4) atenuar, aliviar o mitigar el trastorno, o síntomas asociados con el mismo, donde la mitigación se usa en un sentido amplio para referirse al menos a una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor y/o tamaño del tumor.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material encapsulante, auxiliar de formulación, o excipiente de cualquier tipo convencional. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación.

El término "composición" o "formulación" se refiere a una mezcla que normalmente contiene un vehículo, tal como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es adecuado para la administración en un sujeto para fines terapéuticos, de diagnóstico, o profilácticos. Puede incluir un cultivo celular en el que el polipéptido o polinucleótido está presente en las células o en el medio de cultivo. Por ejemplo, las composiciones para administración oral pueden formar soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues bucales o polvos.

La presente invención es adecuada para separar conformaciones correctamente plegadas de conformaciones incorrectamente plegadas de etanercept.

El etanercept adecuado para la purificación de acuerdo con el método cromatográfico en modo mixto de la presente invención puede ser producido por células huésped vivas que expresan etanercept, tales como hibridomas en el caso de anticuerpos, o células huésped que se han creado genéticamente para producir el polipéptido en el caso de polipéptidos o anticuerpos de fusión. Los métodos para diseñar genéticamente células para producir polipéptidos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, Nueva York). Dichos métodos incluyen la introducción de ácidos nucleicos que codifican y permiten la expresión del polipéptido en células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células

fúngicas o, preferiblemente, células animales desarrolladas en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero sin limitación, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de E. coli adecuadas incluyen: HB101, DH5.alpha, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de E. coli que no pueda escindir ADN extraño. Las células huésped fúngicas que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, células de *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Algunos ejemplos de líneas de células animales que se pueden usar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3 y W138. Se pueden establecer nuevas líneas de células animales usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección viral y/o selección). Opcionalmente, etanercept se puede secretar por las células huésped en el medio.

Antes de la separación cromatográfica en modo mixto de etanercept correctamente plegado del plegado incorrectamente, la purificación del etanercept expresado puede realizarse por cualquier método estándar. Cuando se produce etanercept intracelularmente, los restos particulados se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el etanercept se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando filtros de concentración de polipéptido estándar. Los inhibidores de la proteasa también se pueden añadir para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de microorganismos.
Etanercept puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, y cualquier combinación de técnicas de purificación conocidas o por descubrir, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de Proteína A, fraccionamiento en una columna de intercambio iónico , precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSET®, una cromatografía de resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio.

En términos muy generales, según se aplica a etanercept, la invención proporciona un método de separación de proteínas que comprende las etapas de (a) introducir una solución que contiene una mezcla de proteínas a base de etanercept que tiene etanercept tanto plegado correctamente como plegado incorrectamente en una resina de cromatografía en modo mixto funcionalizada con restos de intercambio iónico, así como restos de interacción hidrófoba en condiciones capaces de permitir que el etanercept plegado correctamente y plegado incorrectamente se una a la resina; y después (b) lavar la resina con medios de elución capaces de eluir etanercept plegado correctamente de la resina de tal forma que el eluato resultante tenga una proporción más alta de etanercept plegado correctamente que la solución de proteína introducida en la etapa (a).

Opcionalmente, el método puede incluir adicionalmente las etapas preliminares de expresar etanercept en un cultivo de células de mamífero tal como un cultivo de células CHO, y después purificar el producto de expresión usando, por ejemplo, cromatografía de Proteína A, con lo cual la producción de proteína A se convierte en la solución de proteína utilizada en la etapa (a) de la presente invención. Debe entenderse que el método de la invención puede ponerse en práctica de tal forma que las etapas de expresión de mamífero y proteína A, que dan lugar a una solución de partida para su uso en la etapa (a) de la presente invención, puedan realizarse por una primera entidad en un sitio de fabricación dado, mientras que el método de separación en modo mixto de la presente invención podría realizarse por la misma entidad o por una entidad diferente en el mismo o en un sitio de fabricación diferente.

Condiciones para la etapa (a) - Unión a resina en modo mixto CAPTO MMC. En la etapa (a) de la invención, la solución de proteína que comprende etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado debe introducirse en la resina de modo mixto CAPTO MMC para unirse a la misma a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y preferiblemente a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. Como alternativa, cuando se usa resina en modo mixto CAPTO ADHERE, la solución de proteínas en la etapa (a) que comprende etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado debe introducirse en la resina en modo mixto CAPTO ADHERE para unirse a la misma a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,5, y preferiblemente a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

Condiciones para la etapa (b)-Elución de la resina en modo mixto. En la etapa (b) el medio de elución comprende una sal a una concentración predeterminada, y se aplica a la columna de una manera predeterminada eficaz para la elución preferencial de la proteína de etanercept plegado correctamente frente a etanercept plegado incorrectamente. Aunque, en términos generales, el eluato debe contener una relación más alta de etanercept plegado correctamente con respecto a plegado incorrectamente, la solución de sal y la forma de aplicación de la misma a la resina, se selecciona preferiblemente de tal forma que la cantidad de etanercept plegado correctamente excede en gran medida la cantidad de etanercept plegado incorrectamente en el eluato de la etapa (b). Las fracciones eluidas tempranamente pueden contener esencialmente proteína plegada correctamente al 100%. La etapa de elución de la solución salina puede realizarse cambiando (aumentando) la concentración molar de la

solución de sal, tal como a través de un gradiente. El gradiente puede lograrse por etapas, pero se prefiere que sea continuo y lineal. En una realización preferida, la solución de sal contiene cloruro sódico ("NaCl"). El gradiente lineal de NaCl puede ser de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 M.

En una realización alternativa, la solución de sal puede contener sulfato sódico ("Na_2SO_4"). La solución de Na_2SO_4 también se puede aplicar en un gradiente escalonado o lineal, preferiblemente de forma lineal y mucho más preferiblemente de un gradiente de concentración de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 molar.

El etanercept se puede obtener por cultivo en células CHO.

En una realización preferida, la solución de sal comprende NaCl.

Se siguieron los siguientes procedimientos para la expresión, purificación de productos de expresión, y análisis de eluatos que contienen etanercept obtenidos del método de cromatografía en modo mixto de la presente invención:

Expresión de Etanercept. El etanercept se expresa en medios acondicionados ("CM") de células CHO recombinantes transfectadas con un gen que codifica el dominio extracelular de TNFR humano fusionado a Fc humano en el extremo C-terminal. Los ejemplos en la técnica para la expresión de etanercept en mamíferos se pueden encontrar en las siguientes patentes de Estados Unidos: RE 36755; Patente de Estados Unidos N.º 5.605.690; EP 464.533; EP 417.563; Patente de Estados Unidos N.º 8.063.182; y Patente de Estados Unidos N.º 7.294.481.

Cromatografía de Proteína A. El CM obtenido anteriormente se procesa utilizando una columna de Proteína A con 1 ml de columna HiTrap rProteína A (disponible en GE Healthcare) y se equilibra con una solución de fosfato 10 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0. Después de lavar la columna con una solución de clorhidrato de arginina 1 M ("arginina"), citrato 0,1 M, pH 6,0, las proteínas unidas se eluyen por etapas con pH 4,2, 3,7 y 3,0 que contienen arginina 1 M y citrato 0,1 M. Como alternativa, la columna puede procesarse sin arginina en un pH descendente con citrato 0,1 M. En ausencia de arginina, la mayoría del etanercept se eluyó a un pH de 3,85 para proporcionar un eluato que comprendía contaminantes, así como etanercept plegado incorrectamente, fragmentos de etanercept, agregados de etanercept, etc., eluyendo por debajo de este pH. Después, el eluato de Proteína A se somete a Capto™ MMC o Capto™ Adhere en una columna HiTrap (disponible en GE Healthcare) como se describe a continuación en los ejemplos.

Análisis del eluato de Proteína A. El análisis del eluato de Proteína A obtenido anteriormente se expone en las figuras 2A y 2B. La figura 2A muestra el perfil de elución de Proteína A con tampones de pH bajo que contienen arginina 1 M. Se observó un gran pico de absorbancia UV a pH 6,0 (pico marcado como 6,0) y no contenía ninguna banda (figura 2B, carril 4) correspondiente al Etanercept comercial según se examinó por PAGE nativa (carril 1): se ha de apreciar que no hay Etanercept fluyendo a través de la columna de Proteína A (comparar el carril 2 y 3). Aunque no se observaron bandas de proteína a pH 6,0 (carril 4), la gran absorbancia UV observada indica la elución de pigmentos. Después de alcanzar la absorbancia de referencia (figura 2A), la columna se eluyó entonces con arginina 0,1 M, citrato 0,1 M, pH 4,2, dando como resultado un pico de elución agudo (figura 2A, marcado 4,2). El análisis de PAGE nativa de este pico mostró una banda intensa de Etanercept, junto con bandas de baja movilidad de frotis (carril 5). El análisis HIC de la proteína eluida mostró 2 picos, correspondiendo el primer pico al pico principal de Etanercept comercial y correspondiendo el segundo pico a la especie menor también presente en el Etanercept comercial. Aunque la naturaleza del segundo pico no está clara, parece ser una especie mal plegada de Etanercept, ya que se une a la proteína A y, por lo tanto, debería contener el dominio Fc. Las proteínas unidas restantes se eluyeron con pH 3,7 y luego 3,0, conteniendo ambas arginina 1 M. Estos disolventes de pH bajo dieron como resultado la elución de pequeños picos como se muestra en la figura 2A (3,7 y 3,0). El pico de pH 3,7 contenía una pequeña cantidad de etanercept (carril 6), mientras que el pico de pH 3,0 contenía principalmente especies de baja movilidad, correspondientes a las especies mal plegadas, así como a las especies que también pueden agregarse (carril 7). Se observó un patrón de elución similar en ausencia de arginina. Se requirió un pH inferior, por ejemplo, pH 3,85 para eluir etanercept y disminuir además el pH dio como resultado la elución de especies de baja movilidad. El hecho de que estas especies de baja movilidad unidas a la Proteína-A significa que también eran proteínas de fusión Fc. Dado que estas especies se eluyeron a pH más bajo que Etanercept, se unieron a la Proteína A más estrechamente. Estos análisis confirman que la expresión de etanercept en células CHO recombinantes conduce tanto a etanercept nativo (correctamente plegado), correspondiente a las especies correctamente plegadas, como a las especies de baja movilidad, correspondientes a especies incorrectamente plegadas, según se analiza mediante HIC analítica. Dado que la especie mal plegada se eluyó más tarde en HIC, debería ser más hidrófoba que el etanercept nativo. Dependiendo de los clones de CHO y las condiciones de

fermentación, la cantidad de especies correctamente plegadas varió del 40 al 60% en peso del eluato de proteína A. En los ejemplos a continuación, se evalúa la capacidad de la cromatografía en modo mixto para separar las especies plegadas de las especies mal plegadas.

Métodos analíticos.

Las fracciones eluidas de las composiciones de Proteína A, Capto™ MMC y Capto™ Adhere, pueden analizarse usando una variedad de técnicas ya conocidas en la técnica tales como cromatografía por exclusión por tamaño (SEC), SEC desnaturalizado (dSEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y PAGE nativa. Por ejemplo, las técnicas de Cromatografía por Exclusión de Tamaño se describen en Hawe et al., Pharm. Res. 2011, 28: 2302 y/o van Marrschalkerweerd et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78: 213.

SDS-PAGE. Por ejemplo, las fracciones eluidas de Proteína A, Capto™ MMC y Capto™ Adhere se pueden analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódico o nativa (SDS-PAGE o PAGE nativa, respectivamente). Tanto la SDS-PAGE como la PAGE nativa se llevaron a cabo usando gel de Tris-glicina al 6% (disponible en Life Technology). La SDS-PAGE puede realizarse en condiciones no reductoras de manera que puedan observarse los agregados unidos por disulfuros.

Cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones de eluato obtenidas usando los métodos de cromatografía en modo mixto de la presente invención se pueden analizar usando la técnica ya conocida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), un método de cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") en el que los analitos se separan por tamaño (véase, Rogner, M. (2000). Size Exclusion Chromatography. Protein Liquid Chromatography. M. Kastner. Amsterdam, Elsevier. 61: 89-145.). Por ejemplo, y no a modo de limitación, se puede preparar un tampón de fase móvil para que contenga fosfato sódico monobásico monohidrato 50 mM y arginina 150 mM. El pH se ajusta a 6,5 usando HCl 1 M. Las separaciones se pueden realizar usando una columna de protección Tosoh TSK-Gel SWxl 6 mm x 4 cm (cat. n.º 8543) unida linealmente a una Tosoh TSK-Gel G4000 SWxl 7,8 mm x 30 cm (cat. n.º 8542). Para realizar una separación, las columnas se llevan a temperatura ambiente (23 °C) y se equilibran con la fase móvil a un caudal de 0,5 ml/min. Se inyectan 5 microlitros de 50 mg/ml de solución que comprende etanercept en la columna usando un automuestreador. La separación puede realizarse durante aproximadamente 30 minutos a un caudal de aproximadamente 0,5 ml/minuto. El eluyente de columna se controló a una longitud de onda de 280 nm durante este tiempo. La integración se puede realizar utilizando el software Chromeleon (Dionex). Antes de la integración, el cromatograma de SEC para un tampón que no contiene etanercept se resta de todos los cromatogramas. Toda la integración se puede realizar entre tiempos de retención de 12 minutos y 26 minutos. Se usan varios parámetros para definir un pico. El área mínima para un pico detectado se establece en 0,05 mAu * min. La sensibilidad bidimensional para la detección de picos se establece en 0,01 mAu y 75 segundos. Los salientes pico se añaden manualmente usando una herramienta de integración manual. Todos los picos detectados se ajustan manualmente en dos etapas. Primero, los valores iniciales máximos (el límite inferior del pico) se ajustan a la horizontal. En segundo lugar, las posiciones verticales de los valores iniciales máximos se ajustan a las de los valores iniciales del cromatograma. El valor inicial del cromatograma se define como la señal en ausencia de analito. La señal en ausencia de analito se define como la absorbancia en mAu a los 12 minutos de tiempo de retención.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Puede realizarse un análisis por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) con Butyl-Sepharose® usando un gradiente de sulfato de amonio de 1,8 a 0 M. La cromatografía HIC también se realizar de la manera descrita en la patente de Estados Unidos 7.294.481 (véase la columna 19, líneas 49-55). También se hace referencia a la Patente de Estados Unidos N.º 7.157.557; Chew.J, Tetrault J, Ley A. (2008) J Chromatogr A. 1177, 272-81; Gagnon P. y Grund E.(1996) BioPharm, 9, 54-64; y Lu, Y., Williamson, B., y Gillespie, R. Recent advancement in application of hydrophobic interaction chromatography for aggregate removal in industrial purification process. Curr. Pharm. Biotech.

Con respecto al análisis HIC de las preparaciones de etanercept producidas de acuerdo con el método de cromatografía en modo mixto de la presente invención, se aprecia que la figura 4 en la Patente de Estados Unidos 7.294.481, contiene un cromatograma de HIC de una preparación de etanercept en la que hay tres picos, el mayor de los cuales (identificado como "pico 2" en la patente '481) se describe como que representa una proteína de fusión de etanercept plegado correctamente; mientras que el pico menor (identificado como "pico 3" en la patente 481) se sugiere por el titular de la patente para contener etanercept "revuelto" (es decir, se cree en el presente análisis que es sinónimo de plegado incorrecto), así como etanercept agregado (véase la Patente de Estados Unidos 7.294.481 la columna 22, las líneas 13-66, y la figura 5 de la misma). Una ventaja significativa de la presente invención es la capacidad de proporcionar una preparación que contiene etanercept de extraordinaria pureza elevada, con

rendimientos comercialmente atractivos, en la que el "pico 3" del cromatograma de HIC, como se hace referencia en la figura 4 y la figura 5 de la patente 481, y que se cree en el presente documento que comprende etanercept plegado incorrectamente, puede reducirse sustancialmente o eliminarse esencialmente.

El etanercept de alta pureza obtenido usando los métodos de la presente invención se puede usar en formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones también pueden incluir tampones, modificadores de la tonicidad, excipientes, vehículos farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes inactivos usados comúnmente de las composiciones farmacéuticas. Para simplificar, estos se analizan más completamente más adelante en la solicitud.

Los tampones mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones adecuados incluyen histidina, fosfato potásico, citrato sódico o potásico, ácido maleico, acetato de amonio, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), diversas formas de acetato y dietanolamina. La concentración del tampón en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Los tampones se conocen bien en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Los ejemplos de tampones adecuados son fosfato, histidina, citrato, maleato, tartrato, succinato, acetato, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), bicarbonato.

Un tampón preferido es fosfato sódico.

Se prefiere que el pH de la composición farmacéutica esté en o cerca de niveles fisiológicos. Por lo tanto, preferiblemente, el pH de las composiciones proporcionadas está entre aproximadamente 5,8 y aproximadamente 8,4; y aún más preferiblemente, entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 7,4. Un experto en la técnica entenderá que el pH puede ajustarse según sea necesario para maximizar la estabilidad y la solubilidad de etanercept en una formulación particular. Por lo tanto, también se describen las formulaciones de etanercept a un pH fuera de los intervalos fisiológicos, pero tolerables para el paciente.

Un modificador de la tonicidad es una molécula que contribuye a la osmolalidad de una solución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se ajusta preferiblemente para maximizar la estabilidad del principio activo y/o minimizar la incomodidad para el paciente tras la administración. En general, se prefiere que una composición farmacéutica sea isotónica con suero, es decir, que tenga la misma o similar osmolalidad, que se consigue mediante la adición de un modificador de la tonicidad.

Se prefiere que la osmolalidad de las formulaciones proporcionadas sea de aproximadamente 180 a aproximadamente 420 mOsM. Sin embargo, debe entenderse que la osmolalidad puede ser mayor o menor según lo requieran las condiciones específicas.

Los ejemplos de modificadores de la tonicidad adecuados para modificar la osmolalidad incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (que no incluyen arginina) (por ejemplo, cisteína, histidina y glicina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de sodio) y/o sacáridos/polioles (por ejemplo, sacarosa, glucosa y manitol).

Los modificadores de la tonicidad preferidos son glicina, alanina, cloruro de sodio, cloruro de potasio y sulfato de sodio.

La concentración del modificador de la tonicidad en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M, más preferiblemente entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Los modificadores de la tonicidad se conocen bien en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en proveedores comerciales.

Los excipientes, también denominados aditivos químicos, cosolutos o codisolventes, que estabilizan el polipéptido mientras están en solución (también en formas secas o congeladas) también se pueden añadir a una composición farmacéutica. Los excipientes se conocen bien en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en proveedores comerciales.

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, azúcares/polioles tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina sérica (albúmina de suero bovino (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, poli(alcohol vinílico) PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); disolventes no

acuosos tales como: PEG, y glicerol y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: prolina, L-serina, ácido glutámico sódico, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina y ácido gamma-aminobutírico; tensioactivos tales como: Tween®-80 (polisorbato 80), Tween®-20 (polisorbato 20), SDS, polisorbato, poloxámeros; y excipientes misceláneos tales como: fosfato potásico, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones metálicos (por ejemplo, cinc, calcio y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta -mannoglucerato, o cualquier combinación de los anteriores.

Los excipientes preferidos son sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano (HSA), albúmina recombinante, dextrano, PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), PEG, etilenglicol, glicerol, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina, SDS, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de cinc, iones de calcio, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-beta-mannoglucerato.

La concentración de uno o más excipientes en una formulación de la invención está preferiblemente entre aproximadamente el 0,001 al 5 por ciento en peso, más preferiblemente aproximadamente del 0,1 al 2 por ciento en peso.

Si se desea, puede usarse una preparación de etanercept preparada según la presente invención en la misma formulación en la que se suministra actualmente Enbrel comercial, comprendiendo dicha formulación, de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mg/ml) de la formulación, y comprendiendo adicionalmente sacarosa, cloruro de sodio, clorhidrato de L-arginina, y fosfato de sodio.

Como alternativa, las preparaciones de etanercept obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar en una formulación farmacéutica que no contiene arginina; por ejemplo, cualquiera de las formulaciones que no son de arginina que se describen en las solicitudes provisionales de Manning et al. USSN 61/548.518 y 61/669480 presentadas el 18 de octubre de 2011 y el 9 de julio de 2012, respectivamente.

También se describe un método para tratar un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento a un mamífero, en el que el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse beneficiosamente con etanercept.

Se prefiere que el etanercept se obtenga de la misma especie de mamífero que se trata con la composición.

Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar con las composiciones incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn (o enfermedad inflamatoria intestinal), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), Hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, psoriasis y dermatitis atópica. Las enfermedades o trastornos adicionales que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención incluyen los descritos en los documentos WO 00/62790, WO 01/62272, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2001/0021380, y la Pat. de Estados Unidos 7.648.702 B2.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto que necesita tratamiento mediante inyección sistémica, tal como mediante inyección intravenosa; o mediante inyección o aplicación al sitio relevante, tal como por inyección directa, o aplicación directa al sitio cuando el sitio está expuesto a cirugía; o por aplicación tópica.

Un método de tratamiento y/o prevención de la artritis reumatoide comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una de las composiciones de etanercept proporcionadas.

La cantidad terapéuticamente eficaz del etanercept en las composiciones dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la afección, la terapia anterior, y los antecedentes clínicos y la respuesta del paciente al agente terapéutico. La dosis adecuada se puede ajustar de acuerdo con el juicio del médico tratante, de tal forma que puede administrarse al paciente una vez o durante una serie de administraciones.

La cantidad eficaz de etanercept por dosis para un adulto es de aproximadamente 1-500 mg/m^2, o de aproximadamente 1-200 mg/m^2, o de aproximadamente 1-40 mg/m^2 o de aproximadamente 5-25 mg/m^2.

Como alternativa, se puede administrar una dosis fija, cuya cantidad puede variar de 2-500 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o de aproximadamente 10-80 mg/dosis.

Si la dosis va a administrarse más de una vez por semana, un intervalo de dosis ejemplar es el mismo que el anterior intervalo de dosis descrito o menor y preferiblemente se administra dos o más veces por semana a un intervalo de dosis de 25-100 mg/dosis.

Una dosis aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosis, o como alternativa, que contiene 80 mg por dosis.

La dosis se puede administrar semanalmente, cada dos semanas o separada por varias semanas (por ejemplo, de 2 a 8).

El etanercept puede administrarse a una concentración de 25 a 75 mg/ml mediante una sola inyección subcutánea (SC).

En algunos casos, se obtendrá una mejora en la afección del paciente administrando una dosis de hasta aproximadamente 100 mg de la composición farmacéutica de una a tres veces por semana durante un período de al menos tres semanas. El tratamiento durante períodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejora. Para condiciones crónicas incurables, el régimen puede continuarse indefinidamente. Para pacientes pediátricos (edades 4-17), un régimen adecuado puede implicar la administración de una dosis de 0,4 mg/kg a 5 mg/kg de etanercept, una o más veces a la semana.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden preparar en una formulación a granel, y como tal, los componentes de la composición farmacéutica se ajustan para que sean más altos de lo que se requeriría para la administración y se diluyen apropiadamente antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales según sea necesario. Por lo tanto, los métodos de tratamiento y/o prevención se usan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. El otro agente activo puede administrarse antes, durante o después de administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se puede administrar otro agente activo como parte de las composiciones proporcionadas, o como alternativa, como una formulación separada.

La administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas se puede lograr de varias maneras, incluyendo administración parenteral, oral, bucal, nasal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraventricular, intracraneal, intratraqueal, intratecal, inyección intramuscular, inyección intravítrea, y aplicación tópica.
Las composiciones farmacéuticas son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracerebroespinal, intraarticular, intrasinovial y/o intratecal. La administración parenteral puede ser mediante inyección en bolo o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Además, se han desarrollado varios enfoques de administración de fármacos recientes y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para administración usando estos nuevos métodos, por ejemplo, Inject-ease®, Genject®, plumas de inyector tales como GenPen®, y dispositivos sin aguja, tales como MediJector® y BioJector®. La composición farmacéutica también se puede adaptar para métodos de administración aún por descubrir. Véase también Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las formulaciones pueden modificarse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar, si se desea, en un vial, paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El dispositivo dispensador puede comprender una jeringa que tiene una dosis única de la formulación líquida lista para inyección.

La jeringa puede ir acompañada de instrucciones para la administración.

También se describe un kit o recipiente, que contiene una composición farmacéutica acuosa obtenida de acuerdo con la invención. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica acuosa puede variar en un amplio intervalo, pero generalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20.000 microgramos por mililitro (µg/ml) de formulación acuosa. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que están destinados a ser solo ilustrativos, ya que muchas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

Ejemplos 1

Purificación en modo mixto Capto™ MMC usando elución de NaCl

En este ejemplo, un eluato de Proteína A obtenido como se ha descrito anteriormente se somete a cromatografía Capto™ MMC. La columna Capto™ MMC se equilibra con una solución de citrato 5 mM, pH 4,5. Una dilución apropiada de eluato de Proteína A (por ejemplo, dilución de 3 a 6 veces dependiendo del tampón de elución de la etapa de Proteína A) con citrato 5 mM da como resultado la unión completa a la columna. Como se mostró en los análisis de SDS-PAGE, la muestra de carga (pH 4,2, eluato de Proteína A) es altamente heterogénea y no fluye proteína a través de la columna Capto™ MMC. Las proteínas unidas luego se eluyen con una solución de NaCl 0,15 M en fosfato 10 mM, pH 7,5 que conduce a un cambio simultáneo en el pH (de 4,5 a 7,5) y concentración de NaCl (de 0 a 0,15 M). Se observa un pico de elución agudo que contiene etanercept plegado correctamente a partir del análisis del eluato. Sin embargo, la recuperación fue de aproximadamente el 40-50%. Después de la etapa de elución como se acaba de describir, la resina que contiene el material de proteína unido restante se pone en contacto con NaCl 0,3 M y las soluciones de arginina 1 M en fosfato 10 mM, pH 7,5, lo que da como resultado eluciones que contienen principalmente especies plegadas incorrectamente, así como agregados unidos por disulfuro. Este ejemplo demuestra que Capto™ MMC es eficaz para separar las especies mal plegadas de las especies correctamente plegadas. El hecho de que las especies mal plegadas eluyan a una mayor concentración de sal (0,3 M frente a 0,1 M) significa que tienen una interacción electrostática más fuerte con la columna. Además, la arginina 1 M aumenta adicionalmente la elución de proteínas mal plegadas y también agregadas, lo que indica que estas proteínas están unidas a Capto™ MMC no solo a través de interacción electrostática sino también por interacción hidrófoba, y que la arginina mejora la alteración tanto de las interacciones electrostáticas como hidrófobas. El análisis de las fracciones de eluato obtenidas en este ejemplo se representa en las figuras 3A y 3B.

Ejemplo 2

Purificación en modo mixto Canto™ MMC usando resina NaCl equilibrada a pH 7,5

En el ejemplo anterior, la solución de proteína que comprende etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado se puso en contacto inicialmente con la resina CAPTO MMC a pH 4,5. En este ejemplo, se observa una elución similar a la observada en el Ejemplo 1 cuando la columna Capto™ MMC se equilibra primero con una solución de fosfato 10 mM, pH 7,5 y luego se eluye con NaCl seguido de arginina. Específicamente, no se eluye etanercept durante este equilibrio de pH. Este resultado es inesperado porque etanercept está cargado negativamente a pH 7,5; la pI de etanercept varía de 4,9 a 5,4 debido a una pesada glucosilación. Por lo tanto, a o por debajo de pH 4,5, el etanercept está cargado positivamente y, por lo tanto, debe unirse a los ligandos de Capto™ MMC cargados negativamente, aunque la interacción hidrófoba puede contribuir a la unión. A un pH de 7,5, el etanercept con carga negativa debe disociarse de la Capto™ MMC cargada negativamente, pero se encuentra que esto no ocurre. Esto puede explicarse por la interacción hidrófoba entre etanercept y Capto™ MMC que supera la repulsión electrostática entre la columna con carga negativa y el etanercept. Como alternativa, Capto™ MMC puede contener la proteína unida uniéndose a las cargas positivas locales en el resto de proteína (pI del resto de proteína es ~8,1).

Ejemplo 3

Purificación en modo mixto Capto™ MMC usando gradiente de NaCl para elución

En este ejemplo, la elución exitosa se logra usando un gradiente de concentración de NaCl. Específicamente, después de lavar la columna con la solución de fosfato 10 mM, pH 7,5, las proteínas unidas se eluyeron con

gradiente de sal lineal de 0 a 0,5 M. La muestra de carga (eluato de proteína A pH 4,2) es extremadamente heterogénea (que contiene tanto etanercept plegado correctamente como plegado incorrectamente) como en el caso anterior, y las proteínas unidas se eluyen con una fuerza iónica creciente del gradiente de NaCl. Después de 180 minutos, el gradiente se termina y la concentración de sal se lleva entonces a 0,5 M, lo que causa una elución de proteína ligeramente mejorada. Según lo determinado por los análisis posteriores, las fracciones bajas en sal contienen más del etanercept plegado correctamente y las fracciones de sal superiores se enriquecieron con especies de baja movilidad (plegadas incorrectamente y agregadas). Finalmente, las proteínas restantes se eluyen con una solución de arginina 1 M, fosfato 10 mM, pH 7,5. Esta fracción no contiene etanercept, sino especies de movilidad completamente baja (mal plegadas/agregadas). El uso de la elución en gradiente de NaCl de Capto™ MMC en diferentes eluatos de Proteína A, combinado con un equilibrio preliminar de la resina da como resultado un eluato más puro en términos de etanercept plegado correctamente. A bajas concentraciones de NaCl en los medios de elución, las muestras eluidas se enriquecen con el etanercept plegado. Las especies mal plegadas aumentan gradualmente en el eluato a medida que el gradiente de sal descrito anteriormente se aplica a la resina. Después de que se completa el gradiente de sal, la resina se pone en contacto con la solución de arginina 1 M, y se encuentra que la fracción de eluato resultante de la misma contiene especies mal plegadas (que incluyen no solo especies mal plegadas sino también agregadas) como es evidente en el posterior análisis de SDS-PAGE. Se cree que algunas de las especies de baja movilidad son etanercept plegado incorrectamente (pero no agregado) en SDS-PAGE, lo que indica que una porción de especies mal plegadas migra como homodímero de etanercept mal plegado con movilidad más lenta en PAGE nativa que el homodímero de etanercept plegado correctamente. El análisis de fracciones de eluato obtenido en este ejemplo se proporciona en las figuras 4A, 4B y 4C.

Ejemplo 4

Purificación en modo mixto Capto™ MMC usando gradiente de Na_2-SO_4 para elución

En este ejemplo, se usa un gradiente de Na_2SO_4 en lugar del NaCl como el gradiente de sal para la elución de etanercept plegado correctamente a partir de la resina en modo mixto. Si bien el NaCl en general se usa exclusivamente para eluir proteínas en IEC, generalmente se sabe que diferentes sales tienen diferentes grados de efectos de precipitación salina (precipitación de proteína). El NaCl es un intermediario entre sales salinas, tal como $MgCl_2$, y sales desalinizadas, tales como Na_2SO_4. El NaCl puede ser eficaz para debilitar la interacción electrostática entre etanercept y Capto™ MMC, pero puede ser neutro en el debilitamiento de la interacción hidrófoba. En el presente documento se pensó que Na_2SO_4 también debería ser eficaz para debilitar la interacción electrostática, pero debería potenciar la interacción hidrófoba porque se conoce como una sal desalinizadora fuerte. Por lo tanto, si las especies de baja movilidad están unidas por la columna mediante interacción hidrófoba como se ha indicado anteriormente, su elución puede suprimirse por Na_2SO_4. Esto se ensaya por elución de la solución de proteína que contiene etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado con un gradiente de Na_2SO_4 de 0 a 0,4 M, después del equilibrio del pH de la columna de resina CAPTO MMC con una solución de fosfato 10 mM, pH 7,5. Después de que se completa la elución del gradiente de Na_2SO_4 de las proteínas, la columna se lava con una solución de arginina 1 M, pH 7,5. La figura 5A muestra el cromatograma de elución, mientras que la figura 5B muestra la SDS-PAGE y la PAGE nativa de las fracciones eluidas. Se observa una banda relativamente marcada de etanercept plegado correctamente en fracciones bajas de Na_2SO_4 (carriles 6 y 7, figura 5B) y la pureza de estas fracciones es mayor que la carga (carril 1). Las concentraciones más altas de Na_2SO_4 dan como resultado la elución de especies de baja movilidad en PAGE nativa (carriles 8 y 9, figura 5B). Una elución de arginina 1 M final a pH 7,5 da como resultado la elución de especies de baja movilidad (mal plegadas/agregadas). Parece haber algo de etanercept en esta fracción (carril 10, figura 5B), lo que indica que Na_2SO_4 también puede suprimir la elución del etanercept nativo. Se puede concluir que Na_2SO_4 es igual, si no más, eficaz para separar las especies plegadas de las especies mal plegadas, aunque puede causar la retención de etanercept nativo (carril 10).

Ejemplo 5

Purificación en modo mixto Capto™ MMC usando elución con gradiente de NaCl y pH

En los ejemplos anteriores, no se observa que las proteínas eluyen durante la etapa de equilibrio del pH, es decir, cambio de pH de 4,5 (citrato 5 mM) a 7,5 (fosfato 10 mM). Sin embargo, cuando la cantidad de carga de proteína aumenta más de 10 mg por 1 ml de columna, éste ya no es el caso. Una elución creciente de las proteínas durante el cambio de pH se produce a mayor carga, aunque el motivo de esta observación no está claro. La pureza de esta muestra eluida es mayor que las muestras de carga, pero es mucho menor que las bajas fracciones de sal. Por ejemplo, cuando la muestra de carga (eluato de Proteína A) contiene solo el 51% de especies de etanercept plegadas correctamente, la elución que ocurre durante el equilibrio de pH es solo un 65% pura, más alta que la

carga pero muy por debajo de las bajas fracciones de sal, mientras que las eluciones de sal en los ejemplos anteriores son capaces de dar una pureza del 96% al comienzo del gradiente de sal, como se determina mediante HIC analítica (figura 6). Como se representa gráficamente en la figura 6, la pureza de las fracciones eluidas disminuye gradualmente del 96% al 20% con concentraciones de sal crecientes, consistente con el resultado de PAGE nativa para Capto™ MMC (figuras 3B, 4B, 5B). La pureza de la fracción de arginina 1 M (en términos de etanercept plegado correctamente) fue baja (solamente el 11%), también consistente con el análisis de PAGE nativa (véase la figura 4B, carril 9 y la figura 5B, carril 10). En vista de las observaciones anteriores, se deduce, en relación con los descubrimientos incorporados en el presente documento, que puede ser beneficioso combinar un gradiente de pH con un gradiente de sal para contrarrestar la pérdida potencial de cualquier especie correctamente plegada durante el equilibrio de pH de la columna para una mayor carga de proteínas. Por consiguiente, en este Ejemplo 5 a continuación, un gradiente de pH se combina con un gradiente de sal cuando se lleva a cabo la etapa (b) definida anteriormente del presente método. En este Ejemplo, la posibilidad de que pequeñas cantidades de etanercept plegadas adecuadamente puedan eluirse indeseablemente durante el equilibrio de pH inicial de la columna de resina en modo mixto se contrarresta combinando un cambio de pH con un gradiente de sal. Específicamente, la proteína unida se eluye mediante un gradiente simultáneo de pH y concentración de NaCl, es decir, la columna se desarrolla a partir de una solución de citrato 5 mM, pH 4,5 con respecto a una solución de fosfato 10 mM, pH 7,5, que contiene NaCl. Esto da como resultado cambios simultáneos tanto del pH como de la concentración de sal, lo que provoca la elución de las proteínas unidas. Esto es similar al perfil de elución de sal después de que se observó el equilibrio de pH ya que las especies de baja movilidad se eluyeron en fracciones posteriores (es decir, a una concentración superior de pH y de sal) y en el lavado final de arginina 1 M, pH 7,5. Por ejemplo, el eluato de Proteína A (24 mg) se une a la columna a pH 4,5 y se eluye mediante un gradiente de citrato 5 mM, pH 4,5 con respecto a fosfato 10 mM a pH 7,5 que contiene NaCl 0,5 M. Se deduce que esta gran carga con equilibrio de pH podría conducir a la elución de las proteínas unidas durante el cambio de pH. El perfil de elución durante el pH y el gradiente de sal de hecho muestra un pico pequeño al comienzo del gradiente y un pico mayor (el etanercept plegado correctamente deseado) en el intermedio del gradiente. El pico pequeño observado puede corresponder a la elución que se habría observado si el equilibrio del pH se realizara inicialmente sin un gradiente de pH/sal. Después de que se completa la elución de gradiente de NaCl/pH, la columna se somete entonces a una elución adicional con una solución de arginina 1 M que da como resultado un pico marcado final correspondiente a especies de baja movilidad. Las fracciones de elución temprana de bajo contenido de sal y bajo pH están enriquecidas con etanercept, mientras que las fracciones con alto contenido de sal y alto pH mostraron elución de las especies de baja movilidad; el pH aumentó gradualmente de 4,5 a 7,5, por ejemplo, pH 4,1-5,1 en las concentraciones intermedias de sal y pH 6,6 al final del gradiente. El lavado final con la solución de arginina 1 M, pH 7,5, muestra una banda de frotis en PAGE nativa y múltiples bandas en SDS-PAGE, esencialmente idénticas a la elución que resulta después del equilibrio inicial de la columna causando el cambio de pH con lavado de fosfato 10 mM, pH 7,5. La recuperación de etanercept plegado correctamente en el grupo fue ~70%. Se obtiene un resultado similar cuando la elución se realiza con el mismo gradiente de pH/sal con respecto a la solución de fosfato 10 mM, pH 7,5, pero termina en una sal más baja que contiene NaCl 0,25 M. Este gradiente que usa una concentración de sal inferior da como resultado una elución incompleta de etanercept con un rendimiento de ~50%. Como en los ejemplos anteriores, se observó un pico grande con lavado de arginina 1 M, que corresponde a especies de etanercept (mal plegado/agregado) de baja movilidad. El análisis de los eluatos obtenidos en este ejemplo se representa en las figuras 7A y 7B.

Ejemplo 6

Purificación en modo mixto Capto™ MMC usando gradiente de Na_2SO_4/pH para elución

Similar a los procedimientos usados en el Ejemplo 5 anterior, también se realizó una elución de gradiente de pH/sal utilizando una solución de Na_2SO_4 0,5 M como disolvente final, que se cree que mejora la resolución de las especies plegadas de las especies mal plegadas. La recuperación de etanercept en el grupo es ~50%, y se cree que la baja recuperación se debe a la interacción hidrófoba mejorada por Na_2SO_4 0,5 M, que conduce a la retención no solo de especies mal plegadas que eluyen principalmente en lavado de arginina 1 M, sino también al etanercept, que también apareció en el lavado de arginina 1 M. Por lo tanto, el uso de Na_2SO_4 puede mejorar la separación (es decir, la resolución) de las especies mal plegadas de las plegadas correctamente, pero también reduce la recuperación de etanercept. Para el análisis de los materiales eluidos en este Ejemplo, puede hacerse referencia a las figuras 8A y 8B.

Ejemplo 7

Capto™ Adhere; Elución con NaCl a pH 7,5 y pH 4,5

En este ejemplo, un eluato de Proteína A que comprende especies de etanercept plegadas tanto correcta como incorrectamente se somete a cromatografía en modo mixto utilizando Capto™ Adhere como resina en modo mixto. La unión de la solución de proteínas que comprende especies de etanercept correctamente plegadas e incorrectamente plegadas se realizó a pH 7,5, en la que el etanercept está cargado negativamente y, por lo tanto, debería unirse a los ligandos Capto™ Adhere cargados positivamente. Cuando el eluato de Proteína A a pH 4,2 se dializa frente a la solución de fosfato 10 mM, pH 7,5, se completa la unión a proteínas, pero la elución por sal en solitario (a pH 7,5) es ineficaz, lo que sugiere que Capto™ Adhere es considerablemente hidrófoba. Por lo tanto, se considera que, debido a que el pI de etanercept es 4,9-5,4, a un pH de elución menor de tal vez pH 4,5, la especie de etanercept estaría cargada positivamente y, por lo tanto, repelida de la resina Capto™ Adhere cargada positivamente a pH 4,5. Esta posibilidad se investiga llevando a cabo la elución de especies de etanercept de Capto™ Adhere a pH 4,5. El eluato de Proteína A a pH 4,2 (que se ha dializado a pH 7,5) se une a la Capto™ Adhere equilibrada con una solución de fosfato 10 mM, pH 7,5. Después de la carga de proteínas, la columna se lava con NaCl 0 y 0,2 M en el mismo tampón, sin proteína que eluya en estos lavados.

Ejemplos 8

Capto™ Adhere; Elución con/sin arginina a pH 4,5

A la luz de los resultados del Ejemplo 7, la proteína unida se eluye entonces con una solución de citrato 5 mM, pH 4,5 con y sin arginina. La arginina, en lugar de NaCl, se usa en este ejemplo para investigar la manera en que una especie más hidrófoba (arginina) podría afectar a la elución a la luz de la naturaleza hidrófoba de los ligandos Capto™ Adhere. Se encuentra que las especies de baja movilidad (mal plegadas/agregadas) junto con etanercept plegado correctamente se eluyen con una solución de lavado de citrato 5 mM, pH 4,5 (que no contiene arginina). La elución de las especies de baja movilidad en esta fracción puede deberse a un cambio repentino en el pH, ya que el pH medido de esta fracción fue de 3,0. Cuando se repite esta etapa con arginina 0,1 y 0,2 M en una solución de citrato 5 mM, pH 4,5, solo se observan cantidades marginales de etanercept plegado correctamente. La elución completa del etanercept plegado correctamente requirió arginina 0,5 M, sin embargo, el eluato incluye una cantidad no deseada de especies de baja movilidad. Por lo tanto, se encuentra que incluso a pH 4,5, la arginina es ineficaz a bajas concentraciones, y a concentraciones más altas de arginina, da como resultado una resolución deficiente entre las especies plegadas y mal plegadas. Véase la figura 9 para el análisis de los eluatos obtenidos en este ejemplo.

Ejemplo 9

Capto™ Adhere; Elución con dos gradientes de arginina y gradiente de pH de 7,5 a 4,5

Se deduce entonces que un gradiente combinado de pH/arginina podría dar como resultado una mejor resolución entre las especies adecuadamente plegadas y mal plegadas. Como en los ejemplos anteriores para CAPTO MMC, se puede evitar una caída de pH durante el equilibrio de pH de 7,5 a 4,5 usando citrato 5 mM aplicando un gradiente de pH simultáneo que después se puede acoplar con un gradiente de concentración de arginina (por ejemplo, un gradiente de fosfato 10 mM a pH 7,5 a con respecto a citrato 5 mM, pH 4,5 que contiene arginina). Dos gradientes de arginina se investigaron con este gradiente de pH. En el caso de un gradiente de arginina con respecto a arginina 0,25 M (figura 10A y 10B), se encontró que un lavado final de arginina 0,5 M dio como resultado la elución tanto de especies de baja movilidad como de etanercept, indicando que el uso de un gradiente para una concentración de arginina de solo 0,25 M de arginina sería insuficiente para la elución completa del etanercept plegado correctamente. Por consiguiente, se investigó un gradiente de arginina de 0-0,5 M (acoplado con el gradiente de pH anterior de 7,5 a 4,5) (figura 11A y 11B). Es evidente a partir del posterior análisis de PAGE nativa que la altura relativa del pico fue menor para el lavado de arginina 1 M final con el gradiente de arginina más alto que el gradiente de arginina 0,25 M anterior. No se observa un segundo pico que sugiera que la resolución puede haberse visto comprometida. El gradiente de pH es tal que el pH de las fracciones eluidas disminuye gradualmente de 7,5 a 6,0, 5,7, 5,2 y finalmente 4,5. Con respecto a la arginina 0,5 M y el gradiente de pH, dos fracciones en el pico de elución principal están enriquecidas con etanercept plegado correctamente con una recuperación de proteína a ~65%. La última parte del gradiente mostró una banda de frotis que contenía etanercept. Por lo tanto, aunque el gradiente de arginina 0,5 M junto con el gradiente de pH aumentó la elución del etanercept unido, el etanercept plegado correctamente coeluyó con las especies mal plegadas en la parte posterior del gradiente de arginina/pH. El último lavado con arginina 1 M mostró solo una banda de frotis.

Ejemplo 10

Canto™ Adhere; Elución con gradiente de arginina y gradiente de pH de 7,5 a 4,5

Las eluciones con gradiente de arginina también se realizan a pH 7,5 usando grupos de Capto™ MMC. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de fosfato 10 mM, pH 7,5 con respecto a arginina 0,6 M, fosfato 10 mM, pH 7,5. Los perfiles de SDS-PAGE y PAGE nativa muestran la elución de etanercept plegado correctamente en las fracciones intermedias (arginina 0,2-0,4 M) (figura 13). Se observan especies de baja movilidad como se ve en ambos geles en la fracción posterior y un lavado final de arginina 1 M a pH 7,0. En comparación, cuando se reemplaza la arginina 0,6 M por NaCl 0,5 M en la elución en gradiente a pH 7,5, la elución de etanercept se redujo en gran medida. La figura 14 muestra el perfil de elución a pH 7,5 durante el gradiente de sal con respecto a NaCl 0,5 M. Se observaron dos picos durante el gradiente, que contenían principalmente etanercept, pero con un bajo rendimiento. Se eluyó una gran cantidad de etanercept en el lavado final con arginina 1 M, lo que indica que la concentración de sal de NaCl 0,5 M junto con el pH 7,5 no era óptima para la separación del etanercept plegado correctamente del material mal plegado/agregado. Como se ha apreciado anteriormente, la arginina 1 M fue muy eficaz en la elución del etanercept plegado correctamente, aunque con la presencia de especies de baja movilidad. Se observa que modificar el gradiente de elución de sal para aplicar un gradiente de aproximadamente 0 a aproximadamente NaCal 1 M y realizar la elución a pH 8 da como resultado una resolución excelente de etanercept plegado correctamente frente a especies de alta-baja movilidad (mal plegadas/agregadas) en productos de elución temprana de dicho gradiente como se muestra en el Ejemplo 12. Parece que la contribución hidrófoba de la unión de etanercept a Capto Adhere se reduce a pH 8,0, dando como resultado la elución eficaz de etanercept plegado correctamente con NaCl en solitario.

Ejemplo 11

Capto™ Adhere; Elución con gradientes de arginina/NaCl a pH 7,5

En este ejemplo, se investiga un gradiente combinado de NaCl/arginina a pH 7,5. Se investigaron dos de dichos gradientes: El primer gradiente que se investiga para el medio de elución es uno en el que las concentraciones finales de NaCl y arginina son 0,4 y 0,2, respectivamente. Después, se investiga un segundo gradiente en el que las concentraciones finales de NaCl y arginina son NaCl 0,25 M y arginina 0,5 M, respectivamente. En ambos casos, los gradientes se aplican en una solución de fosfato 10 mM, pH 7,5. El primer gradiente todavía era demasiado débil para reducir las interacciones hidrófobas y, por lo tanto, eluir etanercept. El segundo gradiente fue más eficaz, como lo indica un pico más pequeño en el lavado de arginina 1 M final. En particular, según se confirma con SDS-PAGE, la elución de etanercept se produce a lo largo del segundo gradiente ensayado hasta NaCl 0,25 M, arginina 0,5 M sin especies de alto peso molecular (baja movilidad/mal plegadas/agregadas). Esta especie de alto peso molecular luego se eluye en el lavado de arginina 1 M final. En la PAGE nativa, se demuestra que la mayor parte de etanercept nativo plegado correctamente se eluye en la fracción media. Se observó una banda de frotis con el lavado de arginina 1 M. Por lo tanto, resulta evidente que una combinación de arginina y NaCl puede conducir a la elución de etanercept y la separación de especies de baja movilidad y alto peso molecular, correspondientes a las especies mal plegadas. El análisis de HIC de las fracciones de Capto™ Adhere para los grupos de Capto™ MMC (60-80% de pureza) muestra que las fracciones eluidas durante el gradiente (excepto las fracciones de la cola) normalmente dieron una pureza superior al 95%. Los análisis de los materiales eluidos obtenidos en este ejemplo se representan en las figuras 15A y 15B.

Ejemplo 12 - Capto™ Adhere y Capto™ MMC

En este ejemplo, un eluato de Proteína A que comprende etanercept correctamente plegado y mal plegado se obtuvo por un método similar al método de Proteína A descrito anteriormente. El eluato se aplicó posteriormente a una columna Capto™ MMCe, y el grupo de productos se aplicó luego a una columna Capto™ ADHERE para proporcionar un producto de etanercept superior, tanto cuantitativa como cualitativamente.

ETAPA 1. Expansión celular. De una manera conocida en la técnica, la expansión celular necesaria para generar un número suficiente de células para la inoculación de un biorreactor de producción se realiza usando un clon de células CHO que expresan la proteína de fusión de etanercept. El producto de este proceso de expresión (un líquido de cultivo celular recolectado) da como resultado una mezcla de etanercept plegado correctamente, así como etanercept plegado incorrectamente y/o agregado, junto con impurezas adicionales. El fluido de cultivo celular recolectado que comprende dicha mezcla de proteínas se somete a inactivación viral con detergente.

ETAPA 2. Cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad se realiza en el cultivo celular recolectado obtenido en la Etapa 1 anterior usando una columna de afinidad de Proteína A convencional de una manera bien

conocida. La recuperación del producto es aproximadamente del 85%. El producto obtenido es una mezcla de proteínas compleja que comprende etanercept plegado correctamente, etanercept plegado incorrectamente, y/o agregados de etanercept plegado correcta y/o incorrectamente, o fragmentos de proteínas. El producto obtenido a partir de esta etapa de purificación de la columna de afinidad de Proteína A se ajusta a pH 3,5, y después se somete a una etapa de inactivación viral. Después de la inactivación viral, el producto se ajusta a pH 5,5 y luego se aclara adicionalmente de una manera conocida usando un filtro de cápsula obtenido comercialmente.

ETAPA 3A. Cromatografía de intercambio catiónico en modo mixto. Se usa una columna de cromatografía de lecho rellenado de 31,8 l (45 cm de diámetro x 20 cm de altura de lecho) GE Healthcare Capto MMC para purificar el producto obtenido en la Etapa 2 anterior. Antes del uso, la columna se equilibra con 2 VC de acetato 25 mM pH 5,5 y se desinfecta con 2 VC de NaOH 0,1 N, NaCl 1 M y se neutraliza con 2 VC de acetato 25 mM, NaCl 0,7 M, pH 5,5. Después, la columna se equilibra entonces con 8-10 VC de acetato 25 mM a pH 5,5 hasta que el efluente tiene un pH de 5,5 y 3,5 mS/cm. El grupo de Proteína A de la Etapa 2 anterior se diluye a ≤6 mS/cm con WFI y se aplica a una carga de columna de hasta 15 g/l de medio para cada ciclo. La columna se opera a una velocidad lineal de 200 cm/h para dar un tiempo de residencia de 6 minutos. Después de la carga, la columna se lava con 2 VC de acetato 25 mM pH 5,5. El producto se eluye entonces con un gradiente de 8,5 VC, gradiente del 15% al 85% de acetato 25 mM a pH 5,5 con respecto a acetato 25 mM, NaCl 0,7 M, pH 5,5. La recolección de productos comienza a una DO 0,15 (A280, 1,0 cm de longitud de la trayectoria) y la recolección finaliza al 50% del pico máximo. El volumen del eluato es aproximadamente de 5 VC. El producto residual y los contaminantes se eliminan de la columna con 2 VC de Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 8,0 y se descartan. El producto obtenido a partir de la columna en modo mixto se filtra usando un filtro Millipore Opticap XL10, filtro de cápsula Durapore de 0,22 µm (0,69 m^2). El producto obtenido de esta etapa representa una recuperación de aproximadamente el 70% del material de Proteína A obtenido en la Etapa 2.

ETAPA 3B. Cromatografía de intercambio aniónico en modo mixto. Se usa una columna de cromatografía de lecho rellenado de 27,0 l (45 cm de diámetro x 17 cm de altura de lecho) GE Healthcare Capto Adhere para purificar adicionalmente el producto obtenido en la Etapa 3A anterior. Antes de su uso, la columna se equilibra con 2 VC de Tris 25 mM, pH 8,0 y se desinfecta con 2 VC de NaOH 0,1 N, NaCl 1 M y se neutraliza y se equilibra con 2 VC de Tris 25 mM, pH 8,0. Antes de la carga del producto, la columna se equilibra con 3 VC de Tris 10 mM, pH 8,0. El grupo de Capto MMC de la Etapa 3A anterior se ajusta a pH 8,1 con ~0,045 kg de Tris 1 M, pH 8,3 por kg de grupo. El producto de la Etapa 3A anterior se diluyó en línea 1:3,8 con WFI para ajustar la conductividad a 12,0 mS/cm y pH 8,0. El material resultante se aplica entonces a una columna de carga de hasta 15 g/l de medio. La columna se opera a una velocidad lineal de 170 cm/h para dar un tiempo de residencia de 6 minutos. Después de la carga, la columna se lava con 2 VC de Tris 25 mM, pH 8,0. Después, el producto se eluye con un gradiente de 10 VC (20% al 90%) de Tris 25 mM, pH 8,0 con respecto a Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 8,0. La recolección de productos se inicia a una DO de 0,15 (A280, 1,0 cm de longitud de la trayectoria) y la recolección finalizó al 25% del pico máximo. El volumen del eluato es de 4-6 VC. El producto eluido se filtra usando un filtro de cápsula disponible comercialmente y luego se somete de manera conocida a etapas de filtración viral y de filtración de flujo tangencial. La recuperación total del producto de la etapa 3B (incluyendo las etapas finales de filtración viral y de flujo tangencial) fue aproximadamente del 68%. La recuperación del producto medida antes de las etapas de filtración fue aproximadamente del 75%. Una representación esquemática de los datos de HIC obtenidos en las fracciones de elución de esta etapa se representa en la figura 12.

Análisis: Se encontró que el producto filtrado final obtenido en este ejemplo tiene más de aproximadamente el 90% en peso de etanercept plegado correctamente según lo determinado por HIC; menos del 5% en peso de especies de etanercept plegadas incorrectamente según lo determinado por HIC; menos de aproximadamente el 3% en peso de material eliminado por análisis de HIC (que se cree que son fragmentos de etanercept en los que la porción de TNFR del mismo se ha truncado) y una cantidad combinada de etanercept plegado correcta e incorrectamente de más del 95% en peso según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño.

El hecho de que la unión a proteínas ocurriera en presencia de condiciones de precipitación salina sugiere la posibilidad de que la interacción hidrófoba no esté implicada en la unión a etanercept Capto™ MMC y Capto™ Adhere, considerando que la unión de proteína hidrófoba a HIC normalmente requiere una fuerte precipitación salina. Sin embargo, la interacción hidrófoba se puede facilitar en presencia de interacción electrostática entre la proteína y estas resinas en modo mixto. Por lo tanto, sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, la unión de etanercept a la resina en modo mixto puede ser mediada a través de modos tanto de interacción electrostática como hidrófoba incluso en ausencia de condiciones de precipitación salina. La HIC analítica indica claramente que la especie mal plegada, que eluye a una concentración de sulfato de amonio más baja, es más hidrófoba que la especie plegada. Suponiendo que las especies tanto plegadas como mal plegadas tienen una propiedad

electrostática idéntica y se unen igualmente bien al grupo cargado de ligandos Capto™ MMC o Capto™ Adhere, es posible que la contribución hidrófoba más fuerte de las especies mal plegadas haga que se unan más fuertemente a las resinas en modo mixto, necesitando de este modo condiciones de elución más fuertes para las especies mal plegadas como se observa en los ejemplos anteriores. Para Capto™ MMC, esto se puede lograr a una mayor concentración de sal, que puede no ser suficiente para mejorar significativamente la interacción hidrófoba, pero puede ser suficiente para romper la interacción electrostática adicional entre Capto™ MMC y la especie tanto plegada correctamente como incorrectamente. Por el contrario, Capto™ Adhere parece ser más hidrófobo que Capto™ MMC, que requiere arginina o, como alternativa, mayor concentración de sal con mayor pH, para eluir las especies correctamente plegadas. Se requiere una mayor concentración de arginina o condiciones más duras para eluir las especies mal plegadas.

Aunque la presente invención usa las expresiones "mal plegado" o "plegado incorrectamente" o "plegado inapropiadamente" de manera intercambiable, también debe entenderse que estas expresiones están destinadas además a incluir especies agregadas, en el sentido de que las resinas en modo mixto también resultan eficaces en la eliminación de especies agregadas en las mismas fracciones de elución que se encuentra que contienen las especies mal plegadas. De hecho, etanercept forma oligómeros ligados a disulfuro como se observa en la SDS-PAGE. Dichos oligómeros se eluyen principalmente en lavado de arginina 1 M, lo que indica su interacción hidrófoba más fuerte con las resinas. Por consiguiente, para etanercept, parece que tanto Capto™ MMC como Capto™ Adhere pueden dar como resultado la eliminación simultánea de las especies mal plegadas y agregadas. La eliminación de material mal plegado y agregados, ya sean covalentes o no covalentes, es muy deseable para proporcionar productos biofarmacéuticos más seguros debido a la inmunogenicidad potencial del material agregado (ya sea plegado correctamente o incorrectamente).

Con respecto a los efectos de la arginina en los ejemplos anteriores, es evidente que la arginina (clorhidrato de arginina) no solo sirve como sal sino que también debilita la interacción hidrófoba. La arginina es conocida en la técnica por suprimir la agregación de proteínas y la adsorción superficial. Además, la arginina interactúa con grupos aromáticos y, por lo tanto, interfiere con la interacción aromática-aromática o aromática-catiónica entre proteínas o entre proteínas y la superficie. Tanto Capto™ MMC como Capto™ Adhere poseen un grupo aromático que puede contribuir a la unión a proteínas. No podría haberse predicho que tal modo de unión podría verse eficazmente alterado por la arginina, pero no por el NaCl. La arginina también debilita la interacción entre los ácidos grasos, lo que sugiere que puede alterar la interacción hidrófoba, no mediada por grupos aromáticos. La naturaleza hidrófoba de la arginina, aunque no se entiende claramente de forma mecánica, puede desempeñar por tanto un papel importante en la modulación de la interacción proteína-proteína y la adsorción de superficie y, por lo tanto, la elución de proteínas de la resina en modo mixto. Sin embargo, como se muestra en el ejemplo 12 anterior, no es necesario usar arginina para poner en práctica la presente invención con el fin de proporcionar una preparación de etanercept de pureza extremadamente alta. Esto es quizás debido a la débil contribución hidrófoba de las resinas Capto MMC y Capto Adhere a la unión de proteínas. Sin embargo, el uso de arginina junto con NaCl puede mejorar la recuperación y la resolución de la cromatografía en modo mixto para las proteínas.

APÉNDICE A

REALIZACIONES ADICIONALES DE LA DESCRIPCIÓN

A. Un método de cromatografía en modo mixto para separar una proteína plegada correctamente de una proteína plegada incorrectamente, que comprende las etapas de:

(a) unir una mezcla de proteínas que comprende conformaciones tanto plegadas correctamente como incorrectamente plegadas de una proteína dada a una resina de cromatografía en modo mixto que tiene restos de intercambio iónico y restos hidrófobos;
(b) eluir la proteína correctamente plegada de la resina en modo mixto para obtener una segunda mezcla de proteínas que comprende una mayor proporción de proteína plegada correctamente que la primera mezcla de proteínas.

B. El método de la realización A, en el que la resina de cromatografía en modo mixto es una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ MMC.
C. El método de la realización A, en el que la resina de cromatografía en modo mixto es una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ Adhere.
D. El método de cualquiera de las realizaciones A-C, en el que las conformaciones proteicas plegadas

correcta e incorrectamente comprenden etanercept plegado correctamente e incorrectamente plegado.

E. El método de la realización D, en el que el etanercept plegado incorrectamente constituye menos de aproximadamente el 10% en peso, y preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso del eluato obtenido en la etapa (b); el etanercept plegado correctamente constituye más de aproximadamente el 90% en peso y preferiblemente más de aproximadamente el 95% en peso del eluato obtenido en la etapa (b); y una cantidad combinada de etanercept correctamente plegado y plegado incorrectamente constituye al menos aproximadamente el 95% en peso por ciento, y preferiblemente al menos aproximadamente el 98% en peso del eluato obtenido en la etapa (b).

F. El método de cualquiera de las realizaciones A a E, en el que la resina en modo mixto es Capto™ MMC y las etapas (a) y (b) del método se realizan a un pH de entre aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5; y la etapa de elución (b) se realiza poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución de sal.

G. El método de cualquiera de las realizaciones A a E, en el que la resina en modo mixto es Capto™ Adherente y las etapas (a) y (b) se realizan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5; y la etapa de elución (b) se realiza poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución de sal, comprendiendo dicha solución opcionalmente además arginina.

H. El método de las realizaciones F o G, en el que la solución de sal se aplica en la etapa (b) a través de un gradiente en el que la concentración de sal se aumenta gradualmente.

I. El método de la realización H, en el que el gradiente de concentración de sal de la etapa (b) provoca un aumento en la concentración de sal de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 M.

J. El método de cualquiera de las realizaciones F a I, en el que la sal se selecciona de cloruro de sodio y sulfato de sodio.

K. El método de cualquiera de las realizaciones A a J, en el que, durante la etapa (b), el pH de la solución que entra en contacto con la resina en la etapa (b) se cambia gradualmente.

L. El método de la realización K, en el que el pH aumenta gradualmente.

M. El método de la realización K, en el que el pH disminuye gradualmente.

N. El método de cualquiera de las realizaciones A a M, en el que la cantidad de proteína plegada correctamente obtenida en el eluato de la etapa (b) es al menos aproximadamente el 60% en peso de la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas introducida en la resina en la etapa (a).

O. El método de la realización N, en el que la cantidad de proteína plegada correctamente es al menos aproximadamente el 70% en peso de la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas introducida en la resina en la etapa (a).

P. El método de cualquiera de las realizaciones A-O, en el que una mezcla de proteínas que comprende al menos un 90% en peso de etanercept plegado correctamente y preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso de etanercept plegado incorrectamente se obtiene sin realizar, o sin necesidad de realizar ninguna etapa de separación o purificación cromatográfica para separar etanercept plegado correctamente del plegado incorrectamente, distintas de las siguientes:

> (1) una o más etapas de purificación, que comprenden preferiblemente una etapa de purificación cromatográfica de proteína A, donde dichas etapas se emplean para purificar un fluido de cultivo de células recolectadas que contiene proteínas a base de etanercept, y donde dicha etapa de purificación no realiza una separación apreciable de etanercept correctamente plegado del incorrectamente plegado.
>
> (2) las etapas cromatográficas en modo mixto (a) y (b) enumeradas en la realización 1; y
>
> (3) SEC, HIC u otras etapas cromatográficas analíticas realizadas únicamente con fines de análisis.

Q. El método de cualquiera de las realizaciones A a P, en el que la cantidad de proteína presente en el eluato de la etapa (b) se determina por absorbancia UV en A 280; la cantidad de etanercept plegado correctamente en el eluato de la etapa B se determina mediante cromatografía de interacción hidrófoba; y la cantidad combinada de etanercept plegado correcta e incorrectamente presente en el eluato de la etapa (b) se determina por cromatografía de exclusión por tamaño.

R. Un método de cromatografía en modo mixto para purificar una mezcla de proteínas con el fin de separar etanercept correctamente plegado del etanercept plegado incorrectamente presente en dicha mezcla, comprendiendo el método las etapas de:

> (a) poner en contacto una resina de cromatografía en modo mixto que tiene restos hidrófobos y restos de intercambio iónico con una solución que contiene una mezcla de proteínas que comprende etanercept plegado correctamente y etanercept plegado incorrectamente, de tal forma que tanto el etanercept plegado correcta como incorrectamente se fijan, unen o se capturan en la

resina de cromatografía en modo mixto; y
(b) poner en contacto la resina en modo mixto con una solución capaz de eluir las proteínas etanercept de la resina de cromatografía en modo mixto para obtener un eluato en el que la relación de la cantidad de etanercept plegado correctamente con respecto a etanercept plegado incorrectamente es mayor que la de la mezcla de proteínas introducida a la resina en la etapa (a).

S. El método de la realización R, en el que la resina de cromatografía en modo mixto es una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ MMC.
T. El método de la realización R, en el que la resina de cromatografía en modo mixto es una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ Adhere.
U. El método de las realizaciones A-T, en el que

(A) el etanercept plegado incorrectamente constituye menos de aproximadamente el 5 por ciento en peso del eluato obtenido en la etapa (b); el etanercept plegado correctamente constituye más de aproximadamente el 90% en peso del eluato obtenido en la etapa (b); y una cantidad combinada de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado constituye al menos aproximadamente el 95 por ciento en peso del eluato obtenido en la etapa (b); o
(B) el eluato, o porción del mismo, obtenido en la etapa (b) comprende etanercept plegado correctamente y está libre, o esencialmente libre, de etanercept plegado incorrectamente.

V. El método de cualquiera de las realizaciones A a U, en el que la resina en modo mixto es Capto™ MMC y las etapas (a) y (b) del método se realizan a un pH de entre aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5; y la etapa de elución (b) se realiza poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución de sal.
W. El método de cualquiera de las realizaciones R a V, en el que la resina en modo mixto es Capto™ Adherente y las etapas (a) y (b) se realizan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5; y la etapa de elución (b) se realiza poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución de sal, comprendiendo dicha solución opcionalmente además arginina.
X. El método de las realizaciones V o W, en el que la solución de sal se aplica en la etapa (b) a través de un gradiente en el que la concentración de sal se aumenta gradualmente.
Y. El método de la realización X, en el que el gradiente de concentración de sal de la etapa (b) provoca un aumento en la concentración de sal de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 M.
Z. El método de cualquiera de las realizaciones V a Y, en el que la sal se selecciona de cloruro de sodio y sulfato de sodio.
AA. El método de cualquiera de las realizaciones R a Z, en el que, durante la etapa (b), el pH de la solución que entra en contacto con la resina en la etapa (b) se aumenta gradualmente o se disminuye gradualmente.
BB. El método de cualquiera de las realizaciones R a AA, en el que la cantidad de proteína plegada correctamente obtenida en el eluato de la etapa (b) es al menos aproximadamente el 60% y preferiblemente al menos de aproximadamente el 70 % en peso de la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas introducida en la resina en la etapa (a).
CC. El método de cualquiera de las realizaciones A a BB, en el que el método se pone en práctica dos o más veces de la siguiente manera:

realizar una primera separación en modo mixto (separación n.° 1) llevando a cabo las etapas (a) y (b); seguida de
realizar una segunda separación en modo mixto (separación n.° 2): llevando a cabo las etapas (a) y (b) de nuevo;

en el que el eluato obtenido en la etapa (b) de la separación n.° 1 se usa como la solución que contiene una mezcla de proteínas en la etapa (a) de la separación n.° 2.

DD. El método de la realización CC, en el que la resina en modo mixto utilizada en la separación n.° 1 es la misma, o diferente, que la resina en modo mixto utilizada en la separación n.° 2.
EE. El método de la realización DD, en el que la separación n.° 1 y la separación n.° 2 se realizan de una manera seleccionada a partir de las siguientes combinaciones:

la separación n.º 1 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto y la separación # 2 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto;
---
la separación n.º 1 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto y la

separación # 2 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto;
---
la separación n.º 1 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto y la separación # 2 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto; o
---
la separación n.º 1 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto y la separación # 2 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto.

FF. El método de la realización EE, en el que la separación n.° 1 y la separación n.° 2 se realizan de la siguiente manera: La separación n.º 1 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto y la separación # 2 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto.

GG. Una mezcla de proteínas que contiene etanercept, o una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende dicha mezcla, obtenida por el método de cualquiera de las realizaciones AA a FF, y en la que dicha mezcla de proteínas comprende etanercept correctamente plegado en una cantidad que constituye más de aproximadamente el 90% en peso de la mezcla de proteínas; y que comprende etanercept incorrectamente plegado en una cantidad que constituye menos de aproximadamente el 5% en peso de la mezcla de proteínas; y en el que la mezcla de proteínas tiene una cantidad combinada de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado que constituye al menos aproximadamente el 95 y preferiblemente al menos aproximadamente el 98% en peso de la mezcla de proteínas que contiene etanercept.

HH. Una formulación farmacéuticamente aceptable que contiene etanercept altamente puro adecuado para su administración a un sujeto que requiere tratamiento para una afección mediada por TNF alfa, conteniendo dicha formulación una mezcla de proteínas que comprende una cantidad principal de etanercept plegado correctamente y una cantidad menor de etanercept plegado incorrectamente, en la que:

(i) el etanercept plegado incorrectamente constituye menos de aproximadamente el 10% en peso, preferiblemente menos de aproximadamente el 8% en peso, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso de la mezcla de proteínas;
(ii) el etanercept plegado correctamente constituye más del 90% en peso y preferiblemente más de aproximadamente el 92% en peso, y preferiblemente más de aproximadamente el 95% en peso de la mezcla de proteína; y
(iii) la cantidad total de etanercept plegado correctamente y etanercept plegado incorrectamente (pero sin incluir agregados de los mismos) constituye al menos el 95 y preferiblemente al menos el 98% en peso de la mezcla de proteínas;

en la que la formulación comprende además principios inactivos, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables que hacen que la formulación sea adecuada para su administración al sujeto.

II. La formulación de la realización HH, en la que la preparación de etanercept constituye aproximadamente de 25 a aproximadamente 75 mg/ml de la formulación, y la formulación comprende además sacarosa, cloruro de sodio, clorhidrato de L-arginina y fosfato de sodio.

JJ. Un método para producir una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una pureza elevada con respecto a la cantidad de etanercept correctamente plegado frente a incorrectamente plegado presente en la misma, comprendiendo dicho método las etapas de:

(1) expresar etanercept en un sistema de expresión de mamífero para obtener un fluido de cultivo celular recolectado que contiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende tanto etanercept plegado correctamente como plegado incorrectamente;
(2) someter el fluido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1 a un proceso de purificación mediante el cual se obtiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una cantidad reducida de, o sustancialmente libre de, impurezas no deseadas presentes en el fluido de cultivo de células de recolección producido en la etapa (1);
(3) poner en contacto la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida en la etapa (2) una o más veces con una resina cromatográfica en modo mixto que tiene tanto restos de intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba para fijar proteínas contenidas en la mezcla a la resina; y
(4) poner en contacto la resina que tiene una proteína unida a la misma de la etapa 3 con una solución para eluir etanercept plegado correctamente de la resina en modo mixto para obtener un

eluato que comprende una mezcla de proteínas que contiene etanercept que tiene una mayor proporción de etanercept plegado correctamente frente a etanercept plegado incorrectamente que la mezcla que contiene etanercept introducida en la resina en la etapa 3;
en el que:

(i) la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida a partir de la purificación de la etapa 2 es al menos aproximadamente el 80% en peso de la cantidad de la mezcla de proteínas a base de etanercept presente en el fluido de cultivo celular obtenido en la etapa 1.
(ii) la cantidad combinada de proteína etanercept plegado correcta e incorrectamente presente en la mezcla de proteínas eluida en la etapa 4 es al menos aproximadamente el 60% en peso de la cantidad de la misma presente en la mezcla de proteínas obtenida de la etapa 2;
(iii) la cantidad de etanercept plegado correctamente presente en el eluato de la etapa 4 es al menos aproximadamente el 30% en peso, y preferiblemente al menos aproximadamente el 35% en peso de la cantidad de mezcla de proteínas que contiene etanercept presente en el fluido de cultivo celular de recolección obtenido en la etapa 1; y
(iv) dicho etanercept plegado correctamente constituye al menos aproximadamente el 90% en peso y preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso del eluato obtenido en la etapa 4.

KK. El método de la realización JJ, en el que la resina en modo mixto se selecciona del grupo que consiste en CAPTO MMC y CAPTO ADHERE.
LL. El método de las realizaciones JJ o KK, que comprende las siguientes etapas adicionales:

Etapa (5): poner en contacto la mezcla de proteínas obtenida en el eluato de la etapa 4 con una resina cromatográfica en modo mixto que tiene tanto restos de intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba para fijar las proteínas contenidas en la mezcla a la resina, y después;
etapa (6): poner en contacto la resina con una solución para eluir etanercept plegado correctamente de la misma para obtener un eluato que comprende una mezcla de proteínas que tiene una mayor proporción de etanercept correctamente plegado frente a incorrectamente plegado;

en el que la resina en modo mixto utilizada en dichas etapas adicionales 5 y 6 es la misma, o diferente de la resina en modo mixto utilizada en las etapas 3 y 4.

MM. El método de la realización LL, en el que la resina en modo mixto usada en la etapa (3) y (4) es CAPTO MMC y la resina usada en las etapas (5) y (6) es CAPTO ADHERE.
NN. El método de cualquiera de las realizaciones JJ a MM, en el que la etapa 4 (y/o la etapa 6 en el caso de la realización LL) se realiza poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución salina para eluir etanercept plegado correctamente de la resina en modo mixto, y opcionalmente (i) en el que la concentración de la solución salina se aumenta gradualmente en las etapas (4) o (6) durante dicho contacto de la solución con la resina; y opcionalmente (ii) el pH de la solución de elución se aumenta o disminuye gradualmente en las etapas (4) y/o (6) durante dicho contacto de la solución con la resina.
OO. El método de cualquiera de las realizaciones JJ a NN, en el que el producto obtenido en una o más de las etapas del método se somete a filtración, tal como filtración vírica y/o filtración de flujo tangencial.
PP. El método de cualquiera de las realizaciones JJ a OO, en el que la etapa 2 se realiza usando una columna de cromatografía de proteína A.
QQ. El método de cualquiera de las realizaciones JJ a OO, en el que la etapa 2 se realiza usando una resina en modo mixto que tiene restos de intercambio hidrófobo e iónico.
RR. El método de cualquiera de las realizaciones A-PP, en el que una mezcla de proteínas que comprende al menos un 90% en peso de etanercept plegado correctamente y preferiblemente menos de aproximadamente el 5% en peso de etanercept plegado incorrectamente se obtiene sin realizar ninguna etapa de separación o purificación cromatográfica para separar etanercept plegado correctamente del plegado incorrectamente, distintas de una o más de las de las siguientes etapas:

(1) opcionalmente, una o más etapas de purificación, que comprenden preferiblemente una etapa de purificación cromatográfica de proteína A, empleándose dichas etapas para purificar un fluido de cultivo de células recolectadas que contiene proteínas a base de etanercept, en el que la etapa

de purificación no separa etanercept correctamente plegado del incorrectamente plegado;
(2) dicha una o más apariciones de las etapas cromatográficas en modo mixto (3) y (4) enumeradas en la realización A (o las etapas 3, 4, 5 y 6 según la realización LL); y
(3) opcionalmente, una o más etapas de cromatografía SEC, HIC u otras etapas de cromatografía realizadas únicamente con fines de análisis.

SS. El método de cualquiera de las realizaciones A a RR, que excluye el uso de cromatografía de interacción hidrófoba de modo único como un medio para separar etanercept plegado correctamente de etanercept plegado incorrectamente, excepto cuando se realiza únicamente con fines de análisis.

TT. Un método para tratar un sujeto que padece una enfermedad mediada por TNF, que comprende las etapas de administrar a dicho individuo una formulación farmacéutica que contiene una mezcla de proteínas que comprende etanercept plegado correctamente y etanercept plegado incorrectamente, obteniéndose dicha mezcla mediante el método de cualquiera de las realizaciones A a SS, en el que la cantidad de etanercept plegado incorrectamente en la mezcla de proteínas es menor de aproximadamente el 5% en peso de dicha mezcla.

UU. El método de la realización TT, en el que la cantidad de etanercept incorrectamente plegado en la mezcla de proteínas es menor de aproximadamente el 3% en peso de dicha mezcla y la cantidad de etanercept plegado correctamente en la mezcla es mayor de aproximadamente el 95% en peso de dicha mezcla.

VV. Un método para tratar un sujeto que padece una enfermedad mediada por TNF, que comprende las etapas de administrar a dicho individuo una formulación farmacéutica que contiene una mezcla de proteínas que comprende etanercept plegado correctamente y etanercept plegado incorrectamente, en el que la cantidad de etanercept plegado incorrectamente en la mezcla de proteínas es menor de aproximadamente el 5% en peso de dicha mezcla.

WW. El método de las realizaciones TT-VV, en el que la cantidad de etanercept incorrectamente plegado en la mezcla de proteínas es menor de aproximadamente el 3% en peso de dicha mezcla y la cantidad de etanercept plegado correctamente en la mezcla es mayor de aproximadamente el 95% en peso de la mezcla.

XX. El método de cualquiera de las realizaciones TT-VV, en el que la cantidad combinada de etanercept correctamente plegado y plegado incorrectamente (excluyendo los agregados del mismo) es al menos aproximadamente el 95% en peso de dicha mezcla.

YY. El método de la realización XX, en el que la cantidad combinada de etanercept correctamente plegado y plegado incorrectamente (excluyendo los agregados del mismo) es al menos aproximadamente el 98% en peso de dicha mezcla.

ZZ. Los métodos o composiciones de cualquiera de las realizaciones A a YY, en los que la expresión "etanercept plegado incorrectamente" se entiende, a menos que se indique lo contrario, que incluye agregados que comprenden etanercept plegado correctamente y/o incorrectamente.

AAA. El método de las realizaciones JJ a QQ, en el que la cantidad de proteína a base de etanercept contenida en el cultivo de células recolectado de la etapa 1 se determina mediante Fc elisa.

BBB. El método de cualquiera de las realizaciones JJ-QQ, en el que la cantidad de proteínas a base de etanercept presente en los eluatos obtenidos a partir de la resina en modo mixto en la etapa 4 (o como en el caso de la realización LL, etapas 4 y 6) se determina por absorbancia UV en A280.

CCC. El método de la realización BBB, en el que la cantidad de proteína a base de etanercept presente en el producto obtenido a partir del proceso de purificación de la etapa 2 se determina por absorbancia UV en A280 o por Fc elisa.

DDD. Un método para separar etanercept correctamente plegado de etanercept incorrectamente plegado, en el que se usan medios cromatográficos para lograr dicha separación, y en el que los medios cromatográficos consisten exclusivamente o esencialmente en cromatografía en modo mixto en la que una mezcla que comprende etanercept correctamente plegado y etanercept plegado incorrectamente se pone en contacto con una resina cromatográfica de modo mixto que tiene intercambio iónico y restos hidrófobos, y entonces se eluye en la misma, para obtener un eluato que comprende al menos aproximadamente el 85 y preferiblemente al menos aproximadamente el 90, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso de etanercept correctamente plegado.

EEE. El método de la realización DDD, en el que la resina en modo mixto se selecciona de CAPTO MMC y CAPTO ADHERE; la elución se realiza con una solución de sal, aplicada opcionalmente usando un gradiente de concentración de sal creciente; el pH de la solución de sal está en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8,5, aplicado opcionalmente en un gradiente en el que el pH aumenta o disminuye gradualmente; y en el que el eluato se obtiene a partir de la resina durante un período de tiempo, y el eluato recogido temprano en dicho período está libre o esencialmente libre de etanercept

plegado incorrectamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cromatografía en modo mixto para separar un etanercept plegado correctamente de un etanercept plegado incorrectamente, que comprende las etapas de:

(a) unir una primera mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende conformaciones de etanercept tanto plegadas correctamente como incorrectamente plegadas a una resina de cromatografía en modo mixto que tiene restos de intercambio iónico y restos hidrófobos;
(b) eluir el etanercept plegado correctamente de la resina en modo mixto poniendo en contacto la resina en modo mixto con una solución salina para obtener una segunda mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende una proporción mayor de etanercept plegado correctamente que la primera mezcla de etanercept.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía en modo mixto es una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ MMC o una resina de cromatografía en modo mixto Capto™ Adhere.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el etanercept plegado incorrectamente constituye menos de aproximadamente el 10% en peso del eluato obtenido en la etapa (b); el etanercept plegado correctamente constituye más de aproximadamente el 90% en peso del eluato obtenido en la etapa (b); y una cantidad combinada de etanercept correctamente plegado e incorrectamente plegado constituye al menos aproximadamente el 95% en peso del eluato obtenido en la etapa (b).

4. El método de la reivindicación 3, en el que la resina de modo mixto es Capto™ Adhere y las etapas (a) y (b) se llevan a cabo a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5; y dicha solución de sal opcionalmente comprende además arginina.

5. El método de la reivindicación 3, en el que la solución de sal se aplica en la etapa (b) a través de un gradiente en el que la concentración de sal se aumenta gradualmente.

6. El método de la reivindicación 1, en el que, durante la etapa (b), el pH de la solución salina que entra en contacto con la resina en la etapa (b) se cambia gradualmente.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de proteína plegada correctamente es al menos aproximadamente el 70% en peso de la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas introducida en la resina en la etapa (a).

8. El método de la reivindicación 1, en el que una mezcla de proteínas que comprende al menos el 90% en peso de etanercept plegado correctamente se obtiene sin realizar, o sin necesidad de realizar ninguna separación cromatográfica o etapas de purificación para separar etanercept correctamente plegado de etanercept plegado incorrectamente, distintas de las siguientes:

(1) una o más etapas de purificación, donde dicha etapa o etapas se emplean únicamente para eliminar impurezas que no están basadas en etanercept;
(2) las etapas cromatográficas en modo mixto (a) y (b) enumeradas en la reivindicación 1; y
(3) SEC, HIC u otras etapas cromatográficas analíticas realizadas únicamente con fines de análisis.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el método se pone en práctica dos o más veces de la siguiente manera:

realizar una primera separación en modo mixto (separación n.° 1) llevando a cabo las etapas (a) y (b); seguida de
realizar una segunda separación en modo mixto (separación n.° 2): llevando a cabo las etapas (a) y (b) de nuevo;

en el que el eluato obtenido en la etapa (b) de la separación n.° 1 se usa como la solución que contiene una mezcla de proteínas en la etapa (a) de la separación n.° 2.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la separación n.° 1 y la separación n.° 2 se realizan de una manera seleccionada a partir de las siguientes combinaciones:

La separación n.º 1 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto y
la separación n.º 2 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto;
la separación n.º 1 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto y la separación # 2 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto;
La separación n.º 1 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto y
La separación n.º 2 usa CAPTO MMC como la resina de cromatografía en modo mixto; o
la separación n.º 1 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto y
la separación n.º 2 usa CAPTO ADHERE como la resina de cromatografía en modo mixto.

11. Un método para producir una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una pureza elevada con respecto a la cantidad de etanercept correctamente plegado frente a incorrectamente plegado presente en la misma, comprendiendo dicho método las etapas de:

(1) expresar etanercept en un sistema de expresión de mamífero para obtener un fluido de cultivo celular recolectado que contiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept que comprende tanto etanercept plegado correctamente como plegado incorrectamente;
(2) someter el fluido de cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1 a un proceso de purificación mediante el cual se obtiene una mezcla de proteínas que contiene etanercept con una cantidad reducida de, o sustancialmente libre de, impurezas no deseadas presentes en el fluido de cultivo de células de recolección producido en la etapa (1);
(3) poner en contacto la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida en la etapa (2) una o más veces con una resina cromatográfica en modo mixto que tiene tanto restos de intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba para fijar proteínas contenidas en la mezcla a la resina; y
4) poner en contacto la resina que tiene una proteína unida a la misma de la etapa 3 con una solución para eluir etanercept plegado correctamente de la resina en modo mixto para obtener un eluato que comprende una mezcla de proteínas que contiene etanercept que tiene una mayor proporción de etanercept plegado correctamente frente a etanercept plegado incorrectamente que la mezcla que contiene etanercept introducida en la resina en la etapa 3;

en el que:

(i) la cantidad de proteína presente en la mezcla de proteínas que contiene etanercept obtenida a partir de la purificación de la etapa 2 es al menos aproximadamente el 80% en peso de la cantidad de la mezcla de proteínas a base de etanercept presente en el fluido de cultivo celular obtenido en la etapa 1.
(ii) la cantidad combinada de proteína etanercept plegado correcta e incorrectamente presente en la mezcla de proteínas eluida en la etapa 4 es al menos aproximadamente el 60% en peso de la cantidad de la misma presente en la mezcla de proteínas obtenida de la etapa 2;
(iii) la cantidad de etanercept plegado correctamente presente en el eluato de la etapa 4 es al menos aproximadamente el 30% en peso de la cantidad de mezcla de proteínas que contiene etanercept presente en el fluido de cultivo celular de recolección obtenido en la etapa 1; y
(iv) dicho etanercept plegado correctamente constituye al menos aproximadamente el 90% en peso del eluato obtenido en la etapa 4.

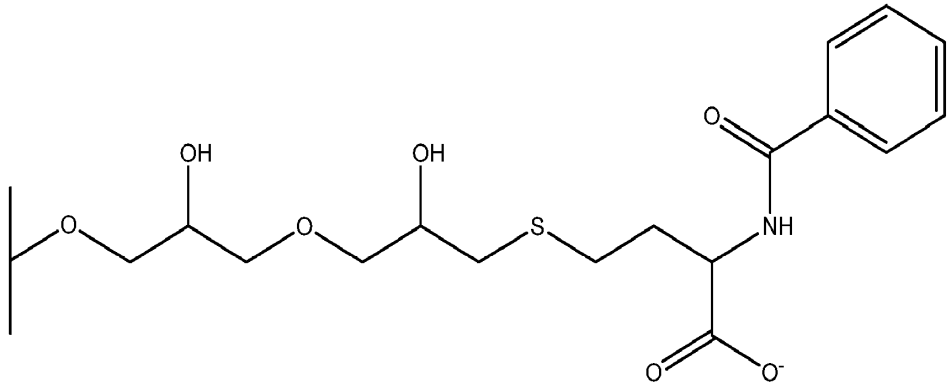
12. El método de la reivindicación 11, en el que la resina en modo mixto se selecciona del grupo que consiste en CAPTO MMC y CAPTO ADHERE.

13. El método de la reivindicación 12, que comprende las siguientes etapas adicionales:

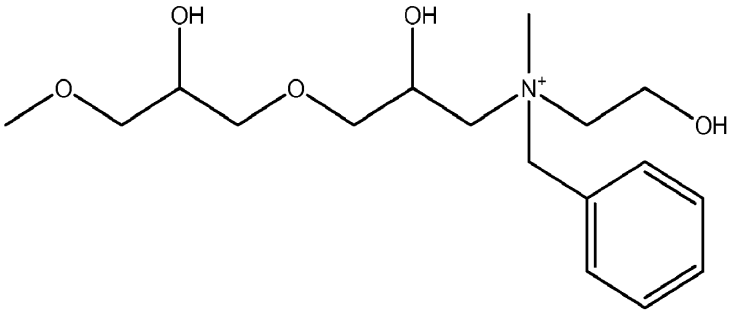
Etapa (5): poner en contacto la mezcla de proteínas obtenida en el eluato de la etapa 4 con una resina cromatográfica en modo mixto que tiene tanto restos de intercambio iónico como restos de interacción hidrófoba para fijar las proteínas contenidas en la mezcla a la resina, y después;
etapa (6): poner en contacto la resina con una solución para eluir etanercept plegado correctamente de la misma para obtener un eluato que comprende una mezcla de proteínas que tiene una mayor proporción de etanercept correctamente plegado frente a incorrectamente plegado;

en el que la resina en modo mixto utilizada en dichas etapas adicionales 5 y 6 es la misma, o diferente de la resina en modo mixto utilizada en las etapas 3 y 4.

14. El método de la reivindicación 1, que excluye el uso de cromatografía de interacción hidrófoba de modo único como un medio para separar etanercept plegado correctamente de etanercept plegado incorrectamente, excepto cuando se realiza únicamente con fines de análisis.



Capto MMC



Capto Adhere

Fig. 1

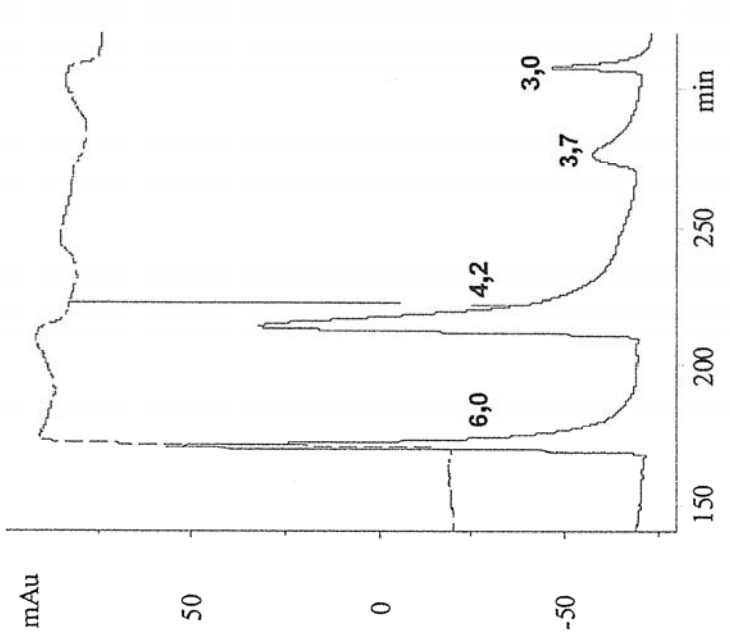


Fig.2A

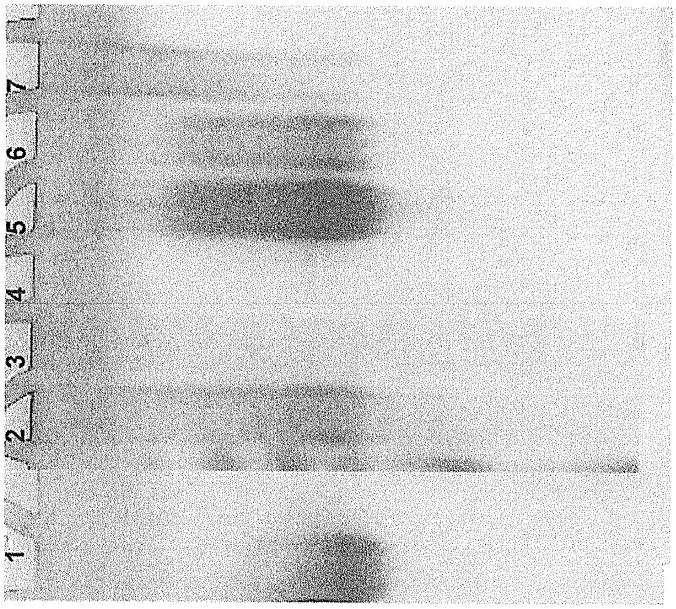


Fig.2B

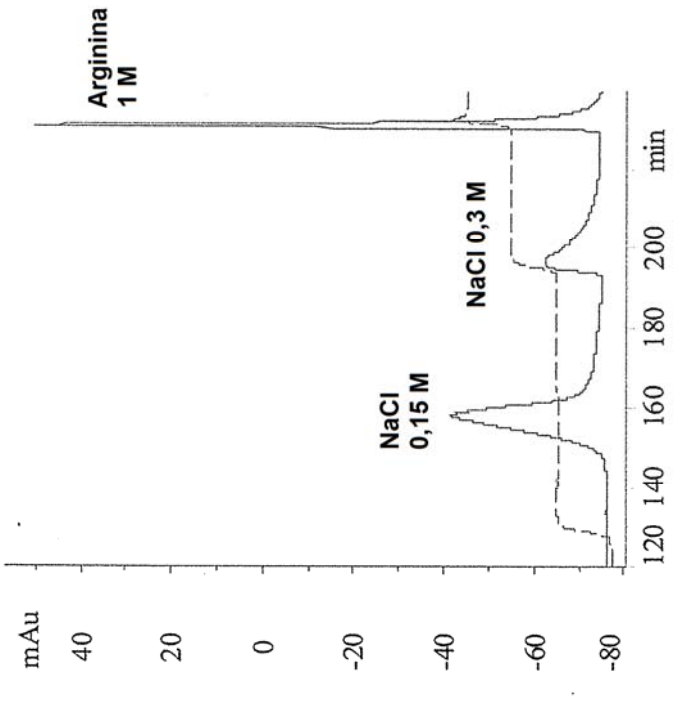

Arginina
1 M
NaCl 0,3 M
NaCl
0,15 M
mAu
40
20
0
-20
-40
-60
-80
120 140 160 180 200
min

Fig.3A

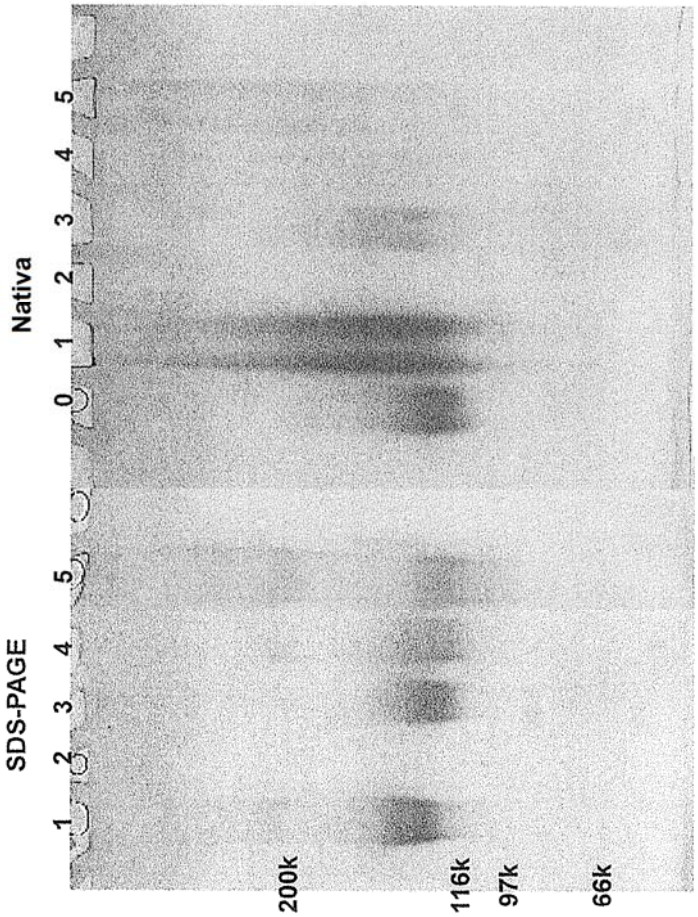


Fig.3B

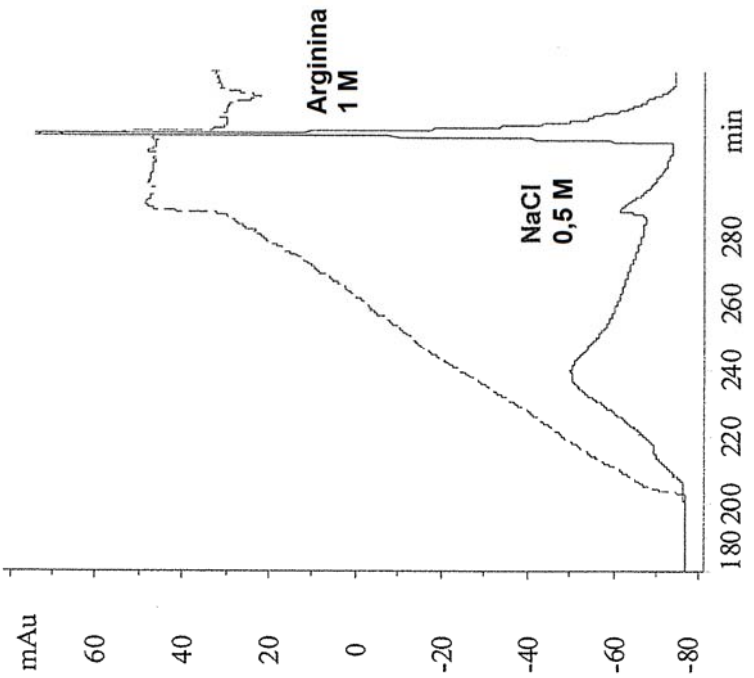

Arginina
1 M
NaCl
0,5 M
mAu
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
180 200 220 240 260 280
min

Fig.4A

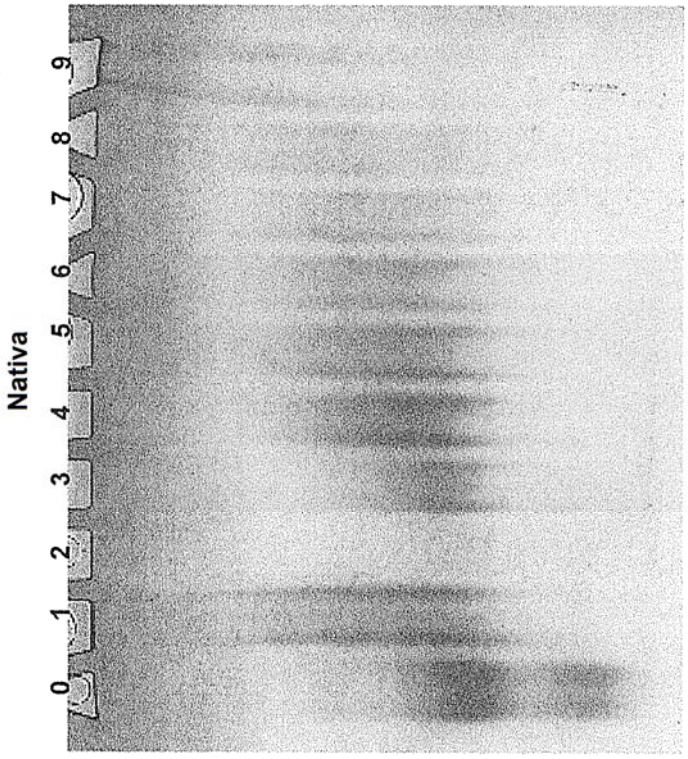


Fig.4B

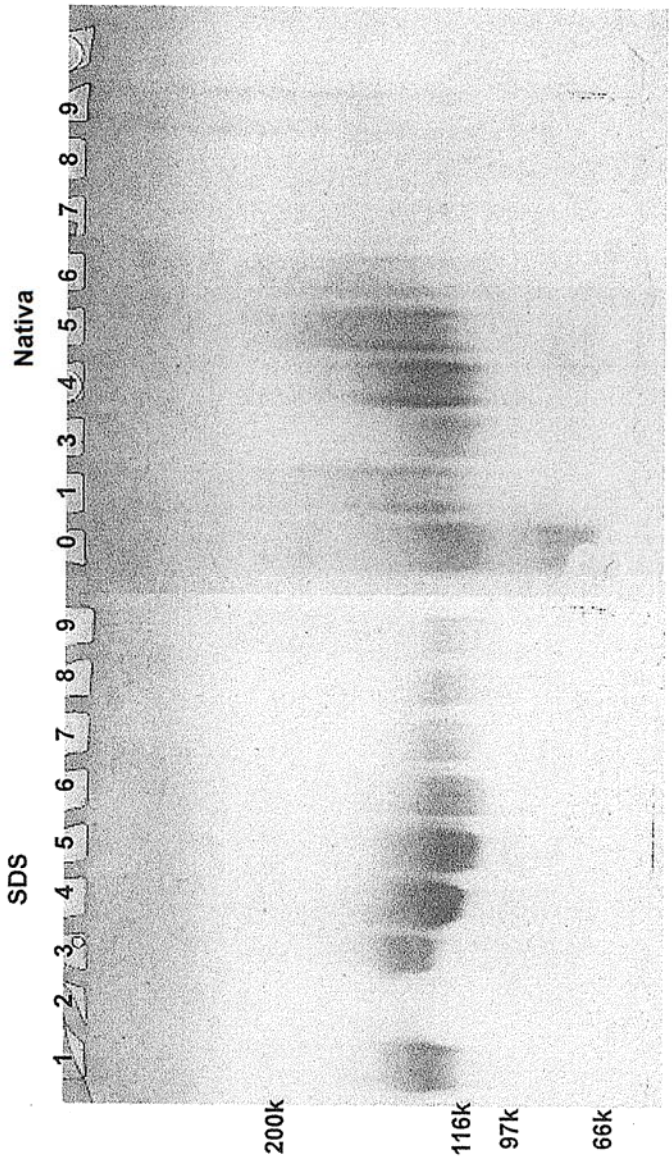


Fig.4C

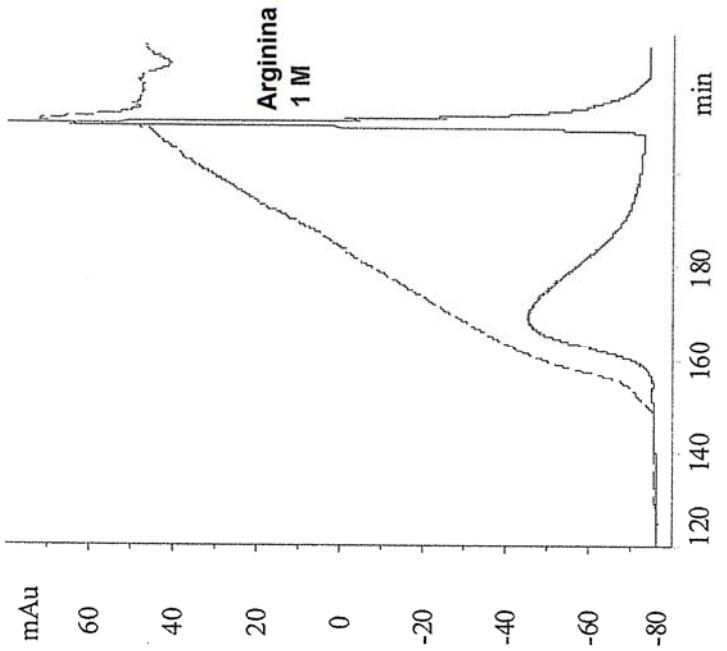


Fig.5A

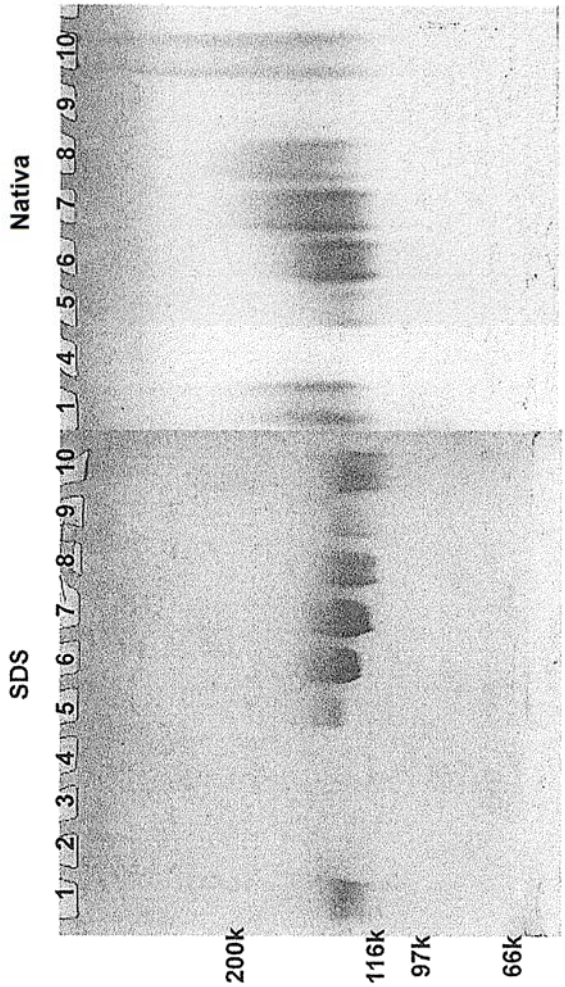


Fig.5B

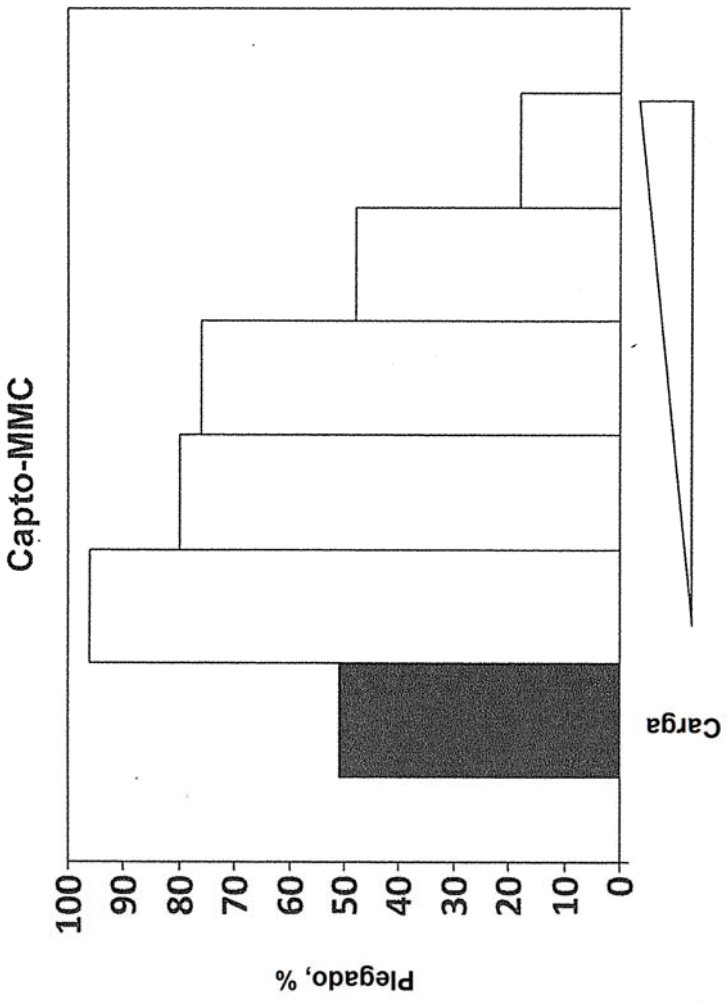


Fig.6

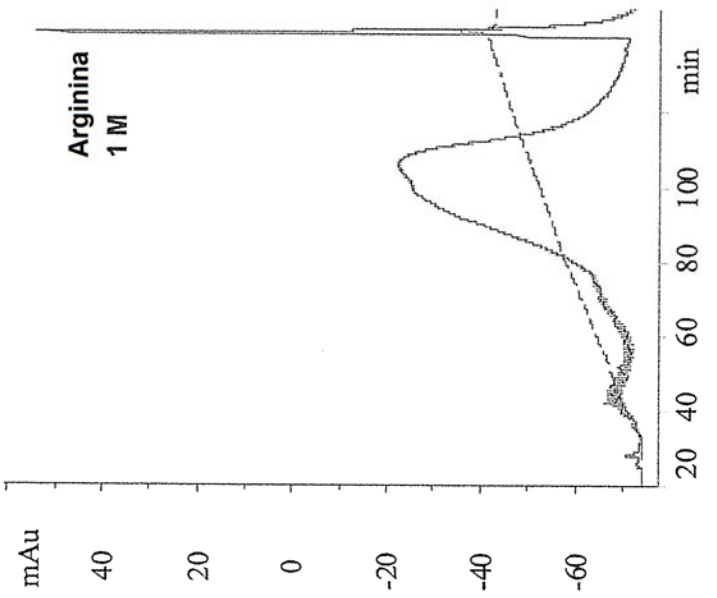


Fig.7A

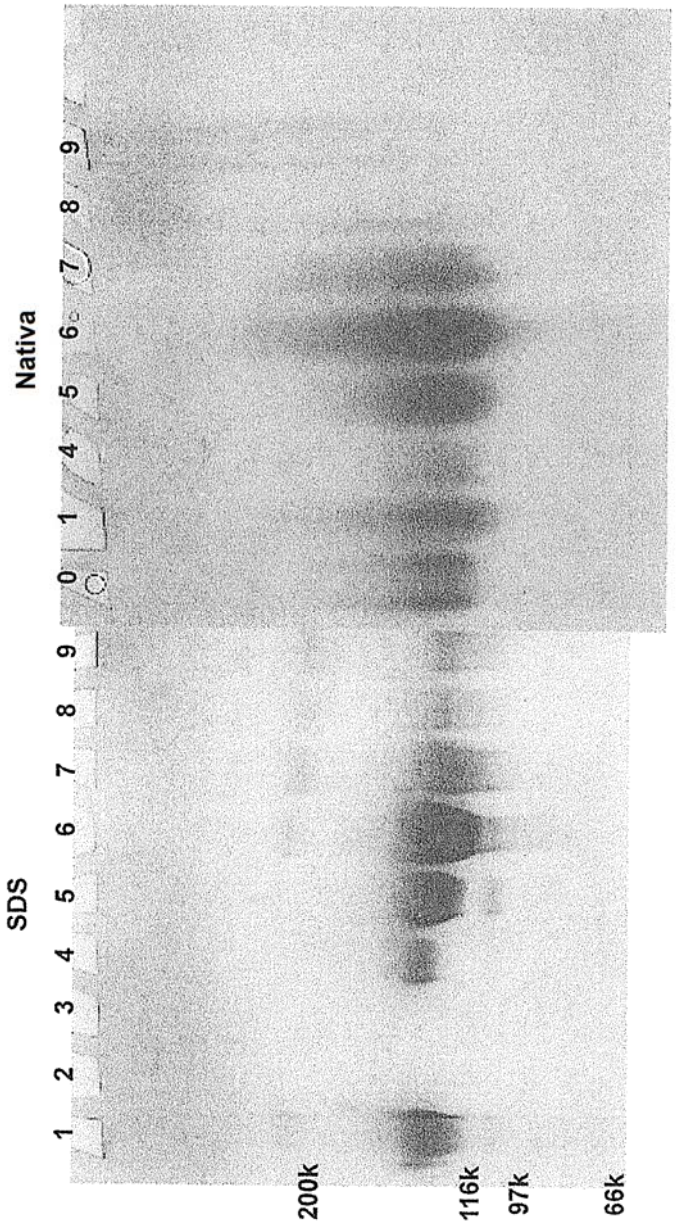


Fig.7B

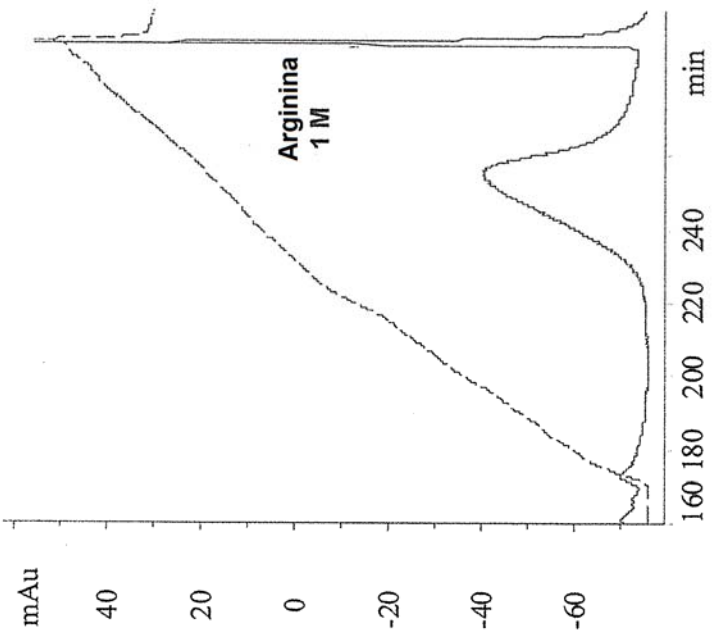


Fig.8A

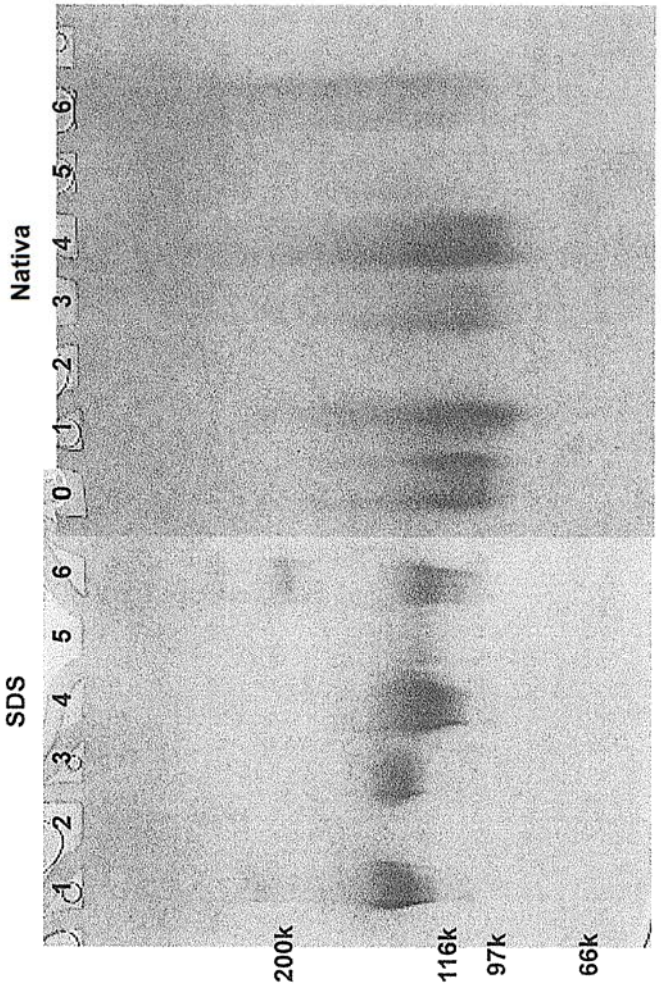


Fig.8B

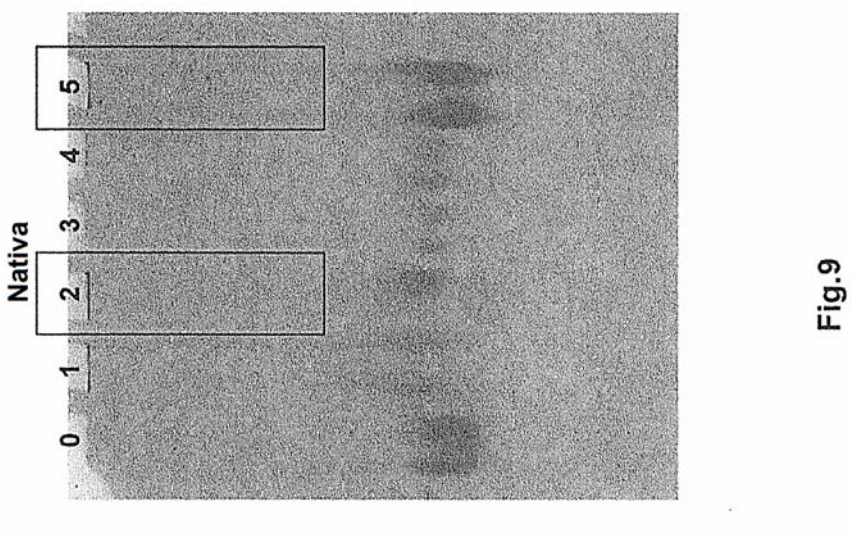


Fig.9

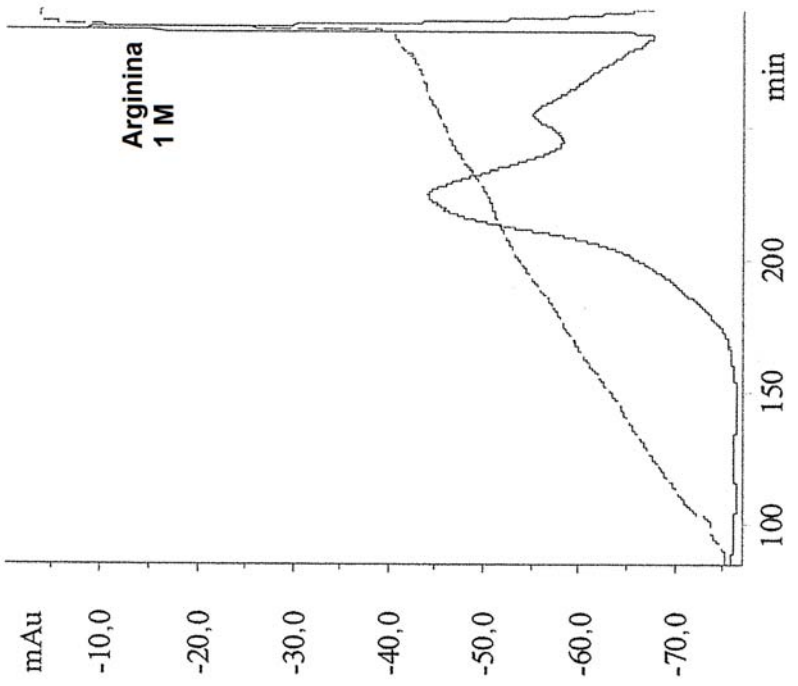


Fig.10A

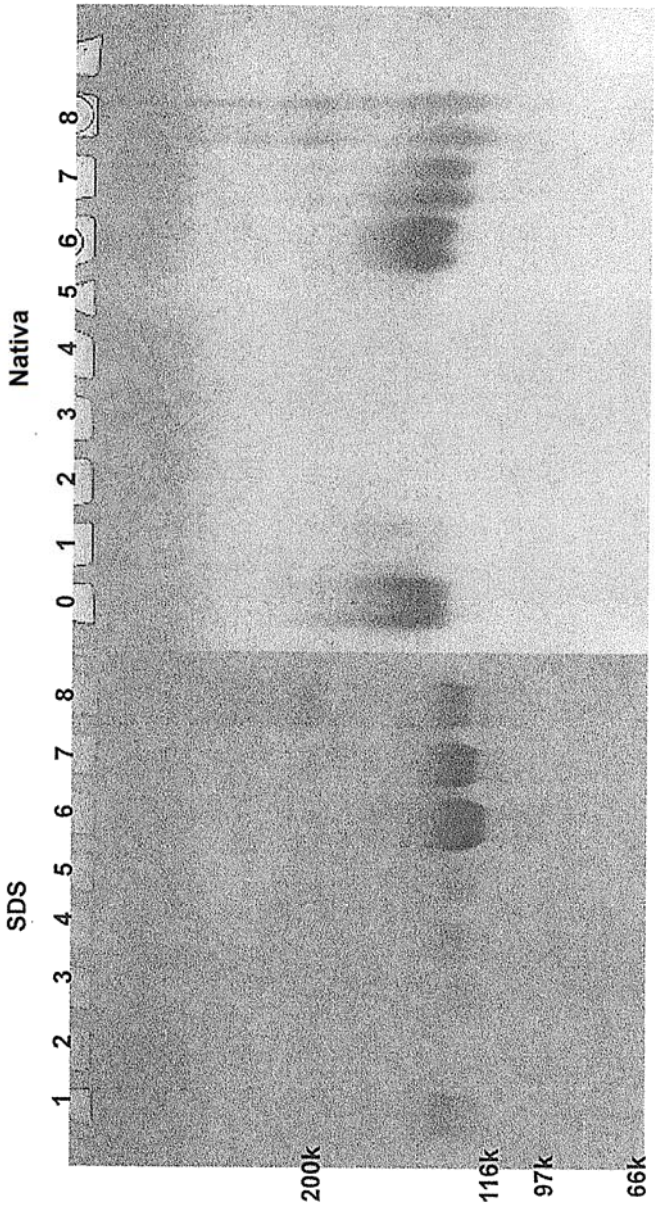


Fig.10B

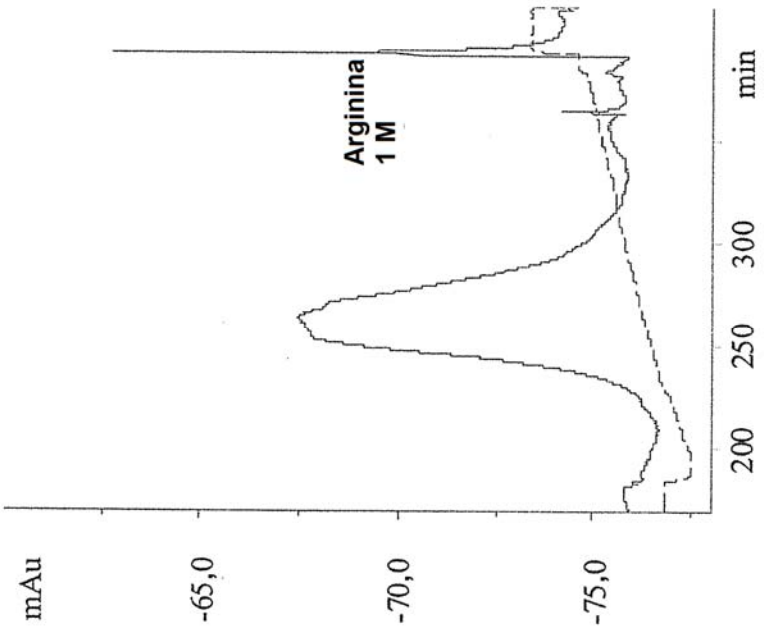


Fig.11A

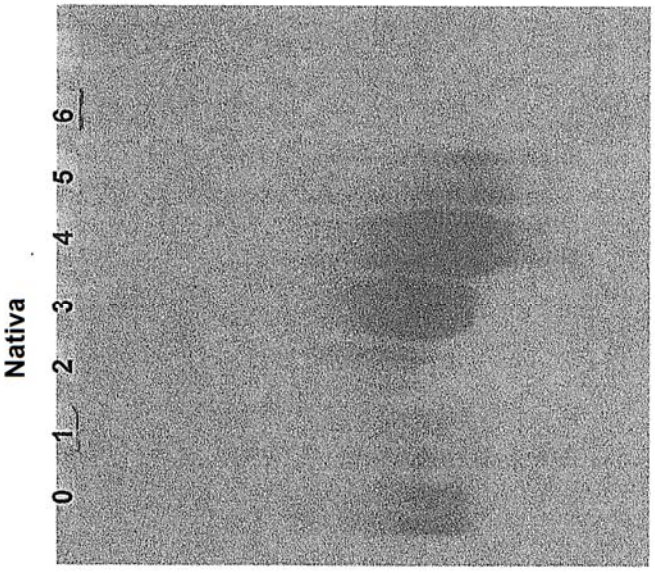


Fig.11B

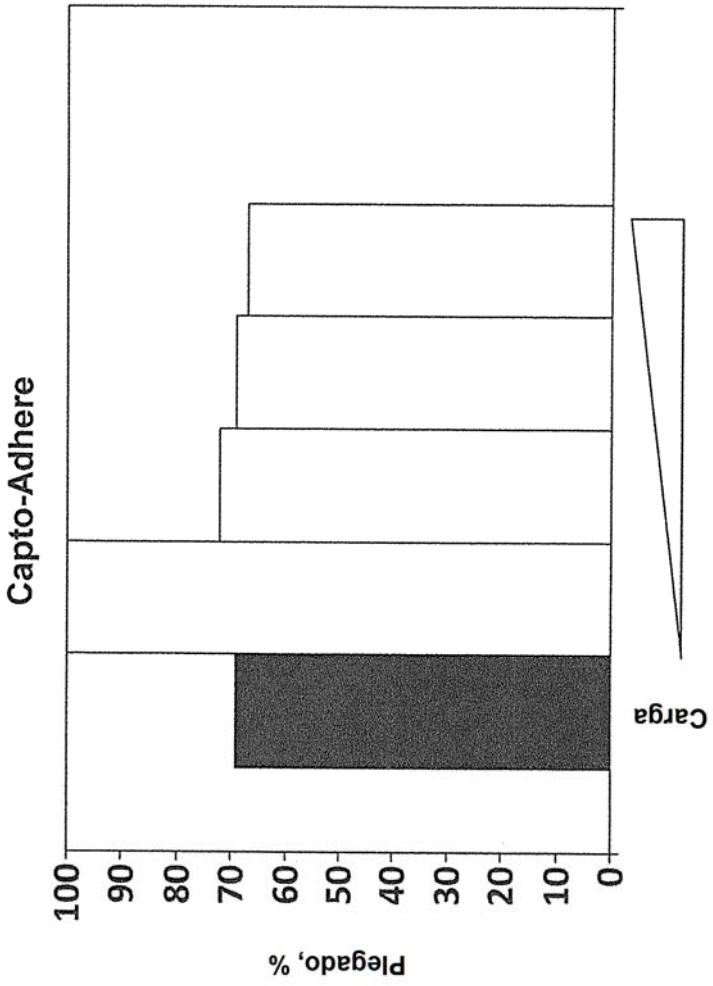


Fig.12

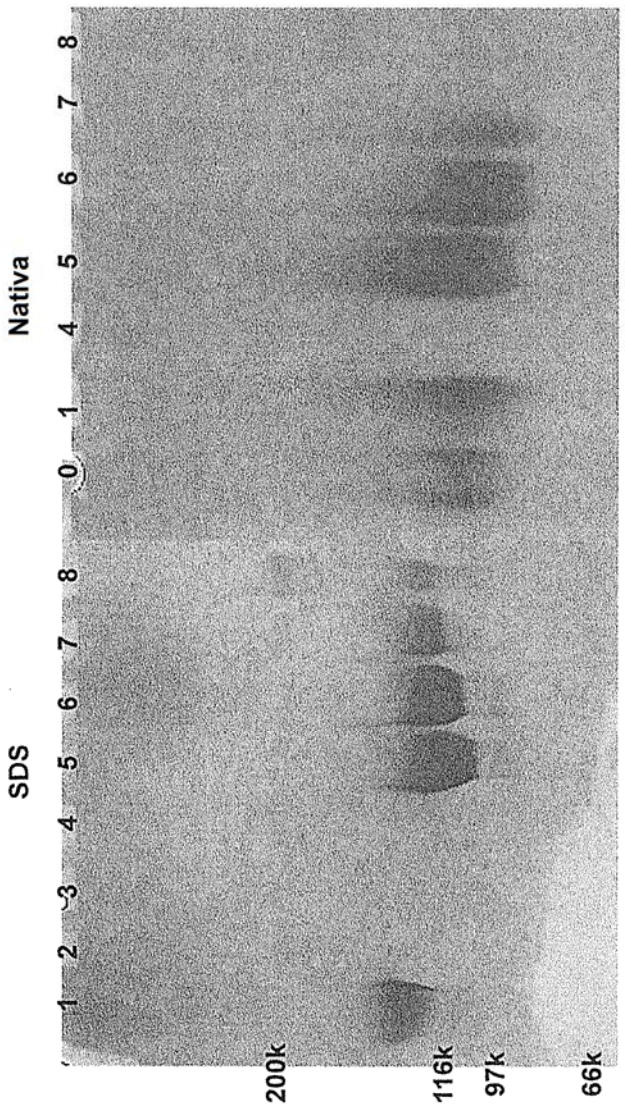


Fig.13

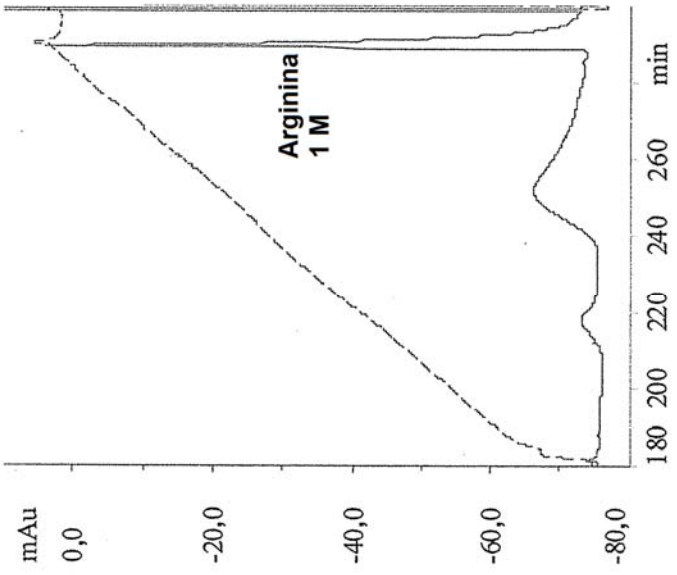


Fig14

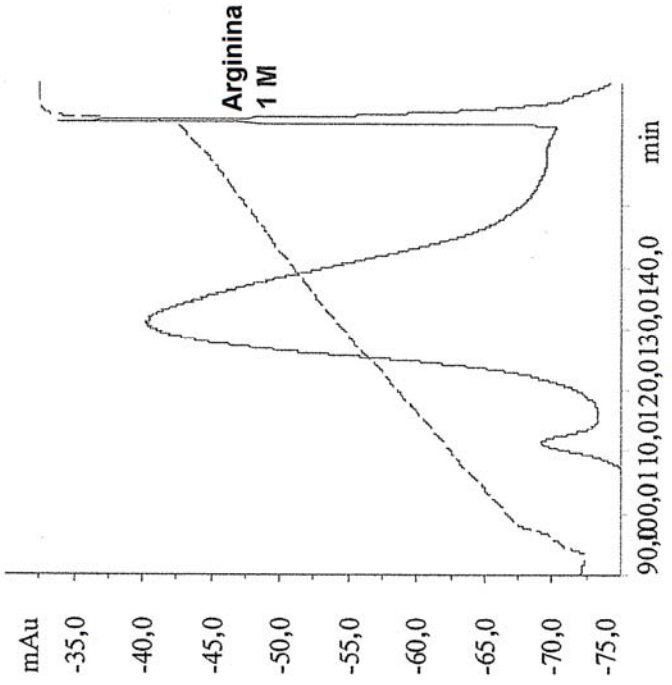

Arginina
1 M
mAu
-35,0
-40,0
-45,0
-50,0
-55,0
-60,0
-65,0
-70,0
-75,0
90,0
100,0
110,0
120,0
130,0
140,0
min

Fig.15 A

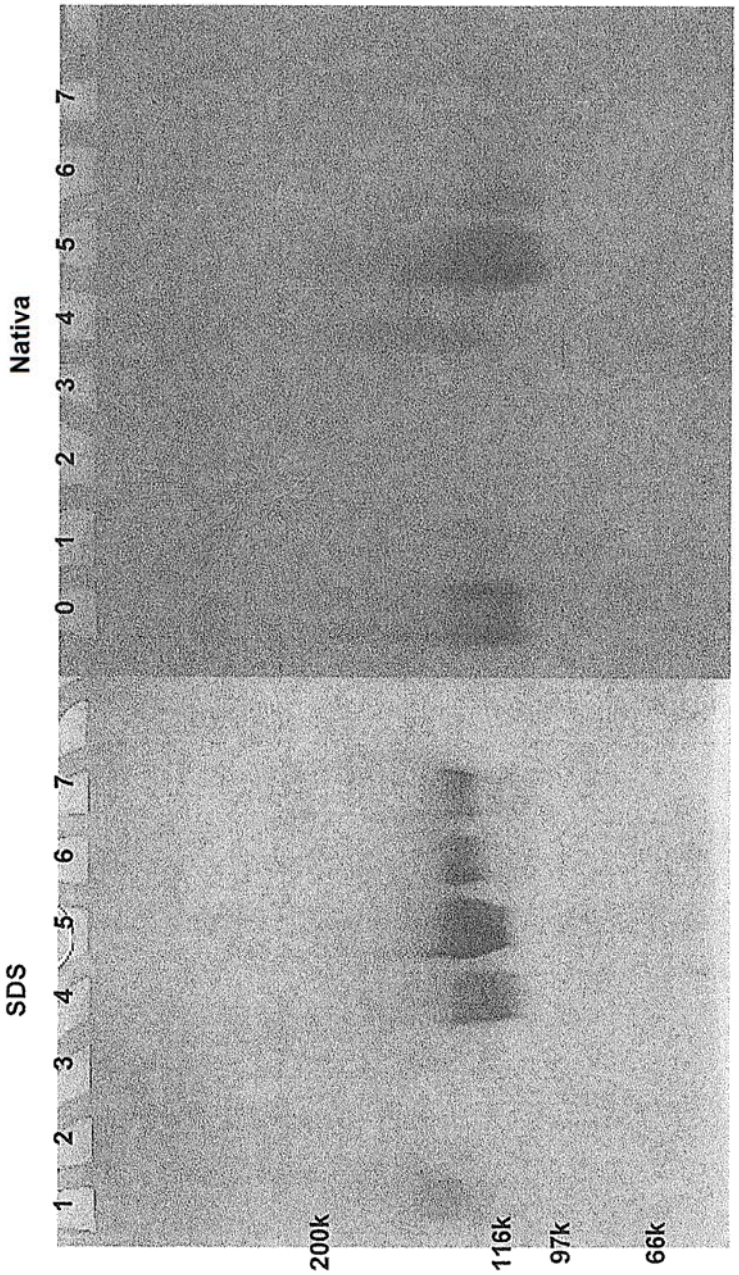


Fig.15B

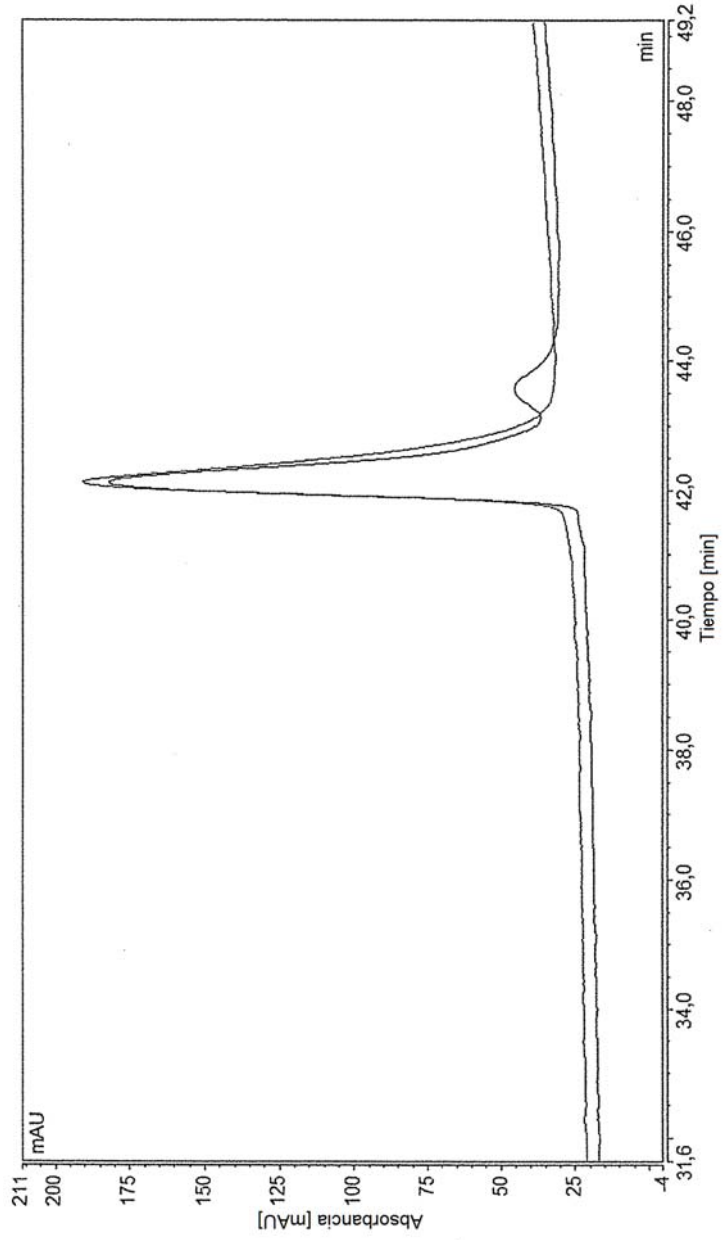

mAU
211
200
175
150
125
100
75
50
25
-4
Absorbancia [mAU]
31,6
34,0
36,0
38,0
40,0
42,0
44,0
46,0
48,0
49,2
Tiempo [min]
min

Fig.16