

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 298**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14177696 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2975050**

54 Título: **Cuantificación de TNFR2:Fc plegado erróneamente**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2019

73 Titular/es:

**SANDOZ AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**RUPPRECHTER, ALFRED;
FUCHS, MICHAEL;
LAMANNA, WILLIAM;
HOLZMANN, JOHANN;
POSCH, CHRISTOPH;
TOLL, HANSJÖRG y
MAYER, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 733 298 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cuantificación de TNFR2:Fc plegado erróneamente

Descripción

5 La presente invención se refiere a métodos para determinar la cantidad relativa de una TNFR2:Fc con puente disulfuro erróneo específica en una muestra de TNFR2:Fc, una proteína de fusión que se usa en una variedad de aplicaciones terapéuticas. Además, la invención se refiere a un método para purificar TNFR2:Fc usando dicho método para determinar la cantidad relativa de dicha TNFR2:Fc con puente disulfuro erróneo específica, y a composiciones de TNFR2:Fc obtenidas de ese modo.

Antecedentes de la invención

10 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es un miembro de un grupo de citocinas que estimulan la reacción de fase aguda, y por tanto es una citocina implicada en inflamación sistémica. TNF-alfa es capaz de inducir inflamación, inducir muerte celular apoptótica e inhibir la tumorigénesis y replicación viral. La desregulación de la producción de TNF-alfa se ha implicado en una variedad de enfermedades humanas como enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis sorriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, Alzheimer así como cáncer.

15 Sus moléculas receptoras incluyen TNFR1 y TNFR2. TNF-R1 se expresa en la mayoría de los tejidos, mientras que TNF-R2 se encuentra solo en las células del sistema inmunitario. Tras el contacto con homotrimeros de TNF-alfa, los receptores de TNF forman trimeros y, por tanto, inician la señalización celular intracelular.

20 Por consiguiente, las moléculas de TNFR solubles o fragmentos de las mismas, que son capaces de unirse a TNF-alfa, pueden usarse como inhibidor competitivo para TNF-alfa. La presente divulgación se refiere a tales moléculas de TNFR2 solubles fusionadas a una porción Fc de una inmunoglobulina humana (TNFR2:Fc), y más particularmente a métodos para determinar, obtener y purificar tales moléculas de TNFR2: Fc.

25 Puede fabricarse TNFR2:Fc mediante un proceso biológico usando células CHO recombinantes, por ejemplo usando células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-). Una forma particular de TNFR2:Fc es etanercept, que consiste en 934 aminoácidos con un peso molecular aparente de 125 kDa. Comprende un homodímero de la porción de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano (p75) unido a la porción Fc de una IgG1 humana. El componente de Fc en ambas moléculas del homodímero contiene las regiones bisagra, CH2 y CH3 completas, pero no la región CH1 de IgG1 (véase la figura 1). Preferiblemente se sintetiza como una proteína soluble, secretada y dimérica, mientras que la dimerización de la región Fc por medio de tres enlaces disulfuro se produce de manera postraduccional.

30 Mediante el uso de cristalografía de rayos X así como de espectrometría de masas, pudo dilucidarse el patrón completo de puentes disulfuro de una forma preferida de TNFR2 humana:Fc, etanercept (véase la tabla 1). Las partes relevantes de las estructuras resueltas de TNFR2 y su superficie de contacto con TNF-alfa se muestran en la figura 2 y la figura 3, mientras que la conectividad de las variantes de disulfuro para la variante principal de TNFR2:Fc se resume en la tabla 1 (véase también la figura 4).

Tabla 1 Patrón de puentes disulfuro de etanercept

Intracatenarios (receptor/parte de Fc)		Intercatenarios
Cys(18)-Cys(31)	Cys(98)-Cys(115)	Cys(240)-Cys(240')
Cys(32)-Cys(45)	Cys(121)-Cys(139)	Cys(246)-Cys(246')
Cys(35)-Cys(53)	Cys(142)-Cys(157)	Cys(249)-Cys(249')
Cys(56)-Cys(71)	Cys(163)-Cys(178)	
Cys(74)-Cys(88)	Cys(281)-Cys(341)	
Cys(78)-Cys(96)	Cys(387)-Cys(445)	
Cys(104)-Cys(112)		

40 Sin embargo, se ha encontrado TNFR2:Fc plegada erróneamente en todas las preparaciones de TNFR2:Fc analizadas.

5 Tal TNFR2:Fc plegada erróneamente no se prefiere cuando se utiliza TNFR2:Fc en cualquiera de las terapias mencionadas anteriormente. El documento US 7.294.481 notifica que dicha TNFR:Fc plegada erróneamente, tal como TNFR2:Fc, se forma tempranamente en el proceso de cultivo celular, se transporta y representa una proporción significativa (aproximadamente el 25-50%) del producto de expresión. Se notifica además que tal TNFR:Fc plegada erróneamente puede reducirse si la célula huésped que produce TNFR:Fc se cultiva a una temperatura de 25-34°C durante la fase de producción. Además, se notifica que tal TNFR:Fc plegada erróneamente puede separarse mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

10 El documento US 2014/072560 da a conocer métodos para separar etanercept plegado correctamente (TNFR2:Fc) de etanercept y agregados plegados incorrectamente, mientras que la divulgación se refiere TNFR:Fc con puentes disulfuro correctos y puentes disulfuro incorrectos.

Martínez *et al.* Journal of Analytical Sciences 18 (2): 248 (2014) se titula "Comparability of a Three-Dimensional Structure in Biopharmaceuticals Using Spectroscopic Methods", y en general describe los antecedentes técnicos de métodos espectroscópicos.

15 El documento WO 2014/144911 A2, presentado el 14 de marzo de 2014 y publicado el 18 de septiembre de 2014, se refiere a inmunoglobulinas híbridas que contienen un enlace no peptídico.

20 Tal como se muestra en la sección de ejemplos en el presente documento, las preparaciones de TNFR2:Fc actualmente disponibles (comercializadas como ENBREL®) contienen todavía TNFR2:Fc con puentes disulfuro erróneos (véase la tabla 4 más adelante). Esto puede deberse a la dificultad de separar el mismo de TNFR2:Fc plegada correctamente. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de métodos para determinar la pureza de TNFR2:Fc en una muestra, en este caso la cantidad de TNFR2:Fc con puentes disulfuro erróneos, que permitan la selección de, por ejemplo, fracciones que tienen el grado más alto deseado pureza.

Sumario de la invención

25 Los inventores identificaron una variante de TNFR2:Fc que comprende un disulfuro con puente incorrecto en la región de unión de la parte de receptor de TNF-alfa a TNF-alfa (Cys₇₈-Cys₈₈) (véanse las figuras 5 y 6). Se demuestra en el presente documento mediante correlaciones entre la bioactividad y la cantidad de la variante con puente incorrecto Cys₇₈-Cys₈₈ ("variante T7" o "T7"), que altas cantidades de esta variante T7 tienen un impacto negativo sobre la potencia (véase la figura 7).

30 Partiendo de este hallazgo, los inventores desarrollaron un método para la cuantificación de la variante T7 mediante mapeo de péptidos no reductor. Al digerir muestras de TNFR2:Fc con tripsina en condiciones no reductoras, la proteína puede escindirarse en componentes más pequeños, mientras que las estructuras de puentes disulfuro permanecen intactas. Después de eso, los péptidos producidos se separan de manera cromatográfica adicionalmente mediante cromatografía de fase inversa y se detectan por medio de detección UV/Vis. Este método permite una cuantificación relativa de la cantidad del denominado péptido T7 que es un péptido obtenido a partir de variantes T7 con puente incorrecto.

35 Preferiblemente, la cantidad de péptido T7 con puente incorrecto puede determinarse a partir de la señal del péptido T7 en el cromatograma obtenido. Por ejemplo puede expresarse como el área de pico para el péptido T7 en relación con el área de pico para un péptido de referencia, que no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro o un péptido de referencia que no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro de los residuos Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆. Mediante el uso del método recién desarrollado es posible identificar muestras en las que eluyen conjuntamente TNFR2:Fc y variante T7 con puentes disulfuro correctos, y que por tanto no pueden agruparse con muestras de TNFR2:Fc puras y/o muestras con una cantidad reducida de variante T7, logrando de ese modo una pureza/potencia mejorada de la composición de TNFR2:Fc final.

45 Más específicamente, se proporciona un método para determinar la cantidad relativa de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ (es decir, variante T7) en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que el método comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra que comprende una mezcla de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ y TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆;
- (b) desnaturalizar y alquilar la muestra de la etapa (a);
- (c) someter la muestra resultante de la etapa (b) a digestión triptica en condiciones no reductoras;
- 50 (d) someter la muestra resultante de la etapa (c) a HPLC, separando de ese modo fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que dichos fragmentos consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7");
- (e) realizar una integración de pico para el pico indicativo de fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7"), y para un pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de

Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 ("T27"), tal como se obtiene a partir de la etapa (d); en el que el pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro en absoluto y es indicativo de la TNFR2:Fc total en la muestra; y

- 5 (f) calcular la cantidad relativa según fórmula (1)

$$\% \text{ rel. (T7)} = \frac{\text{área(T7)}}{\text{área(T7)} + \text{área(T27)}} \times 100 \quad (1)$$

en el que la secuencia de aminoácidos de la parte de TNFR2 de TNFR2:Fc tiene al menos el 97% de identidad con los aminoácidos 23-257 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

- 10 También se proporciona un método de preparación de una composición de TNFR2:Fc que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, en el que el método comprende someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica; en el que dicha una o más fracciones comprenden menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, tal como se determina usando el método para determinar TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ dado a conocer en el presente documento y usando integración de pico de señales de péptido T7 (SEQ ID NO: 4) y T27 (SEQ ID NO: 5) y calculando la cantidad relativa mediante la fórmula (1) tal como se describe más adelante.

- 25 Se proporciona además un método de purificación de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆, en el que el método comprende someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica; en el que la cantidad de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ se determina usando un método tal como se da a conocer en el presente documento.

- 30 Además, la presente divulgación proporciona un método que comprende

(a) producir una composición que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una célula huésped adecuada; y

(b) purificar la combinación obtenida de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ mediante el método de purificación dado a conocer en el presente documento.

- 35 Finalmente, también se da a conocer una composición de TNFR2:Fc, en la que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene una identidad de al menos el 97% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, determinada usando el método para determinar TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ dado a conocer en el presente documento y usando integración de pico de señales de péptido T7 (SEQ ID NO: 4) y T27 (SEQ ID NO: 5) y calculando la cantidad relativa mediante la fórmula (1) tal como se describe más adelante.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 45 La presente divulgación proporciona un método para determinar la cantidad relativa de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra que comprende una mezcla de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ y TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆;

(b) desnaturalizar y alquilar la muestra de la etapa (a);

(c) someter la muestra resultante de la etapa (b) a digestión trípica en condiciones no reductoras;

5 (d) someter la muestra resultante de la etapa (c) a HPLC, separando de ese modo fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en el que dichos fragmentos consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7");

10 (e) realizar una integración de pico para el pico indicativo de fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7"), y para un pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 ("T27"), tal como se obtiene a partir de la etapa (d); en el que el pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro en absoluto y es indicativo de la TNFR2:Fc total en la muestra; y

(f) calcular la cantidad relativa según la fórmula (1)

$$\% \text{ rel. (T7)} = \frac{\text{área(T7)}}{\text{área(T7)} + \text{área(T27)}} \times 100 \quad (1)$$

15 en el que la secuencia de aminoácidos de la parte de TNFR2 de TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% de identidad con los aminoácidos 23-257 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos 1-22 de SEQ ID NO: 1 corresponden al péptido señal recortado en la proteína secretada madura.

20 En el contexto de la presente divulgación, la parte de TNFR2 de TNFR2:Fc se refiere a cualquier polipéptido de TNFR que tenga al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% y lo más preferiblemente el 100% de identidad a lo largo de la longitud completa de una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 150-235, preferiblemente 200-235 y lo más preferiblemente 233-235 aminoácidos de la parte extracelular de TNFR2, y que todavía se une a TNF-alfa, tal como se determina mediante ELISA o cualquier otro ensayo conveniente. Más preferiblemente, dicho TNFR es capaz de unirse a TNF-alfa y linfotóxina alfa (LT-alfa), tal como se determina mediante ELISA o cualquier otro ensayo conveniente. Tales ensayos se los conoce bien el experto en la técnica.

25 Las secuencias de proteína y CDS de TNFR2 (receptor de TNF tipo 2; CD120b; p75/80; para ser humano: sec. de ref. (ARNm): NM_001066, sec. de ref. (proteína): NP_001057 (SEQ ID NO:1)) se conocen en la técnica.

30 Generalmente, un polipéptido tiene "al menos el x% de identidad" a lo largo de la longitud completa de una longitud definida de aminoácidos con otro polipéptido si la secuencia en cuestión se alinea con la mejor secuencia coincidente de la secuencia de aminoácidos y la identidad de secuencia entre las secuencias alineadas es de al menos el x%. Una alineación de este tipo puede realizarse usando por ejemplo programas informáticos de homología disponibles públicamente tales como el programa "BLAST", tal como "blastp" proporcionado en la página web del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi, usando los parámetros por defecto proporcionados en la misma. Se conocen en la técnica métodos adicionales de cálculo de los porcentajes de identidad de secuencia de conjuntos de polipéptidos.

35 La región Fc (fragmento de región cristalizabile) se refiere a la región de la cola de un anticuerpo, en el caso de IgG compuesta por el segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. En ciertas realizaciones, el polipéptido Fc comprende la región constante de una cadena pesada de clase IgG o un fragmento y/o variante de la misma y en otras realizaciones la región constante de otros isotipos de inmunoglobulina puede usarse para generar tales fusiones de TNFR2:Fc. Por ejemplo, podría usarse un polipéptido TNFR2:Fc que comprende la región constante de una cadena pesada de clase IgM o un fragmento y/o variante de la misma. Preferiblemente, el fragmento Fc se deriva de IgG, más preferiblemente de IgG1, incluso más preferiblemente de IgG1 humana. La región constante de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, con un ejemplo específico de un dominio constante de la cadena pesada de la clase IgG1 proporcionado por SEQ ID NO: 2, comprende un dominio CH1 (aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO: 2), una región bisagra (aminoácidos 99 a 110 de SEQ ID NO: 2), un dominio CH2 (aminoácidos 111 a 223 de SEQ ID NO: 2) y un dominio CH3 (aminoácidos 224 a 330 de SEQ ID NO: 2). Tal como se usa en el presente documento, un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios CH1 de cadena pesada, región de bisagra, CH2 y CH3 descritos anteriormente, o fragmentos o variantes de los mismos. Ciertas realizaciones de la invención incluyen TNFR2:Fc que comprende todo o una parte del dominio extracelular de TNFR2 (SEQ ID NO: 1) fusionado a toda o una parte de SEQ ID NO: 2, opcionalmente con un polipéptido ligador

entre la parte de TNFR2 y la parte de Fc del TNFR2:Fc. Por ejemplo, CH1, CH2 y toda la región bisagra pueden estar presentes en la molécula. En realizaciones adicionales, una región constante de cadena pesada que comprende al menos una parte de CH1 es la parte Fc de una TNFR2:Fc. Ciertas realizaciones también pueden incluir, por ejemplo, toda la región bisagra o la mitad C-terminal de la región de bisagra para proporcionar un puente disulfuro entre cadenas pesadas. Si se desea una TNFR2:Fc multimérica, por ejemplo dimérica, es importante incluir la parte de la región bisagra implicada en la formación de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas (por ejemplo, una porción de los aminoácidos 99 a 110 de SEQ ID NO: 2 que incluye el aminoácido 109 de SEQ ID NO: 2). En una realización preferida, la parte de Fc consiste en la región bisagra completa y los dominios CH2 y CH3. Sin embargo, la TNFR2:Fc puede comprender partes del dominio CH3 que no incluyen el residuo de lisina C-terminal (aminoácido 330 de SEQ ID NO: 2), ya que se ha observado que este residuo se elimina en el procesamiento postraduccional de polipéptidos de cadena pesada de IgG. Las fusiones de Fc y los fragmentos de Fc se conocen bien en la técnica.

Preferiblemente, la TNFR2:Fc es esencialmente idéntica/similar a etanercept, más preferiblemente, la TNFR2:Fc es etanercept. Etanercept es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor de TNF-alfa p75, consistiendo cada molécula en un polipéptido derivado de TNFR de 235 aminoácidos que se fusiona a una parte de Fc de 232 aminoácidos de IgG1 humana.

La secuencia de aminoácidos del componente monomérico de etanercept se muestra como SEQ ID NO: 3. En la forma dimérica de esta molécula, dos de estos polipéptidos de fusión (o "monómeros") se mantienen unidos por tres enlaces disulfuro que se forman entre las partes de inmunoglobulina de los dos monómeros. El dímero de etanercept, por tanto, consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 125 kilodaltons.

En América del Norte, etanercept se comercializa por Amgen con el nombre comercial Enbrel®. Wyeth/Pfizer es el único comercializador de Enbrel® fuera de América del Norte, excepto Japón, donde Takeda Pharmaceuticals comercializa el fármaco.

El término "esencialmente idéntico/similar a etanercept" tal como se usa en el presente documento significa que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc aplicada a la etapa (a) tiene al menos el 97% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, preferiblemente al menos el 98% de identidad, más preferiblemente el 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3. Alternativa o adicionalmente, la TNFR2:Fc puede tener el 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y puede diferir o no de etanercept por modificaciones postraduccionales (solo), por ejemplo, por glicosilación. El experto en la técnica conoce bien procedimientos adecuados para cambiar un patrón de glicosilación y las pruebas para determinar un patrón de glicosilación.

La TNFR2:Fc puede producirse de manera recombinante, preferiblemente usando un sistema de expresión basado en células de mamíferos. Preferiblemente, dicho sistema de expresión basado en células de mamíferos es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en líneas celulares de riñón de cría de hámster (por ejemplo, BHK21); líneas celulares de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB o CHO-dhfr-); líneas celulares de mieloma murino (por ejemplo, SP2/0); líneas celulares de mieloma de ratón (por ejemplo, NS0); líneas celulares de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK-293); líneas celulares derivadas de la retina humana (por ejemplo, PER-C6) y/o líneas celulares de amniocitos (por ejemplo, CAP). Preferiblemente, están usándose sistemas de expresión basados en células de hámster. Las células BHK21 ("riñón de cría de hámster") pertenecen a una línea establecida casi diploide de células de hámster sirio, descendientes de un clon de un cultivo primario de crecimiento inusualmente rápido de tejido renal de hámster recién nacido. Ejemplos no limitativos de líneas celulares BHK-21 que están disponibles comercialmente y que pueden usarse en el contexto de la presente invención son BHK-21 (C-13); BHK21-pcDNA3.1-HC; BHK570; línea celular Flp-In-BHK; y/o línea celular de hámster BHK 21 (clon 13).

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son una línea celular derivada del ovario del hámster chino. A menudo se usan en investigación biológica y médica y se utilizan comercialmente en la producción de proteínas terapéuticas. Se introdujeron en la década de 1960 y se hicieron crecer originalmente como un cultivo en monocapa. Hoy en día, las células CHO son los huéspedes de mamífero más comúnmente usados para la producción industrial de productos terapéuticos de proteínas recombinantes y habitualmente se hacen crecer en cultivo en suspensión.

Ejemplos no limitativos de líneas celulares CHO que están disponibles comercialmente y pueden usarse en el contexto de la presente invención con células FreeStyle CHO-S; línea celular ER-CHO; CHO 1-15 500 CHINESE HAM; CHO-DXB, CHOdhfr-, CHO DP-12 clon n.º 1934; CHO-CD36; CHO-ICAM-1; CHO-K1; ovario; HuZP3-CHOLec3.2.8.1; xrs5; células CHO-K1/BB2; células CHO-K1/BB3; células CHO-K1/EDG8/Galpha15; células CHO-K1/M5; células CHO-K1/NK1; células CHO-K1/NK3; células CHO-K1/NMUR1; células CHO-K1/NTSR1; células CHO-K1/OX1; células CHO-K1/PAC1/Gα15; células CHO-K1/PTAFR; células CHO-K1/TRH1; células CHO-K1/V1B; línea celular 5HT1A Galfa-15-NFAT-BLA CHO-K1; línea celular AVPR2 CRE-BLA CHOK1; células CHO-S SFM adaptadas; células DG44; línea celular Flp-In-CHO; línea celular GeneSwitch-CHO; línea celular NFAT-bla CHO-K1; línea celular T-REx-CHO; línea celular estable GenoStat CHO K-1; kit de línea celular estable GenoStat CHO K-1; línea celular CHO-K1 de hámster, línea celular CHO-PEPT1, línea celular CHO SSF3 y/o CHO-HPT1. En una realización particularmente preferida, el sistema de expresión basado en células de hámster es una línea celular CHO-dhfr-.

La muestra que comprende la TNFR2:Fc que va a aplicarse en la etapa (a) puede ser un material de cultivo, tal como un sobrenadante de cultivo celular o un lisado celular. Preferiblemente la disolución es un sobrenadante de cultivo celular libre de células y libre de suero. En una realización incluso más preferida, la disolución se purifica adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad y/o cromatografía de interacción hidrófoba. Generalmente la TNFR2:Fc aplicada en la etapa (a) del método dado a conocer en el presente documento comprende una mezcla de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys78-Cys88 y TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys74-Cys88/Cys78-Cys96.

En una realización preferida, la etapa de desnaturalizar y alquilar (b) se lleva a cabo en un tampón que tiene un pH en el intervalo de 7 a 9, preferiblemente de 7,5 a 8,5, lo más preferiblemente pH 8 aproximadamente. Por ejemplo, el tampón puede ser un tampón TRIS, tal como un tampón que comprende TRIS 10-100 mM, más preferiblemente TRIS 20-80 mM. El tampón comprende además un agente alquilante, por ejemplo yodoacetamida 0,5-1,5 M, preferiblemente yodoacetamida 0,9-1,2 M. Se prefiere adicionalmente que el tampón de la etapa (b) comprenda el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible, preferiblemente el 0,1%-0,2% de un tensioactivo escindible. En general, puede usarse cualquier tensioactivo escindible que no interfiera con la digestión trípica. Se seleccionan tensioactivos escindibles particularmente preferidos de 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)-metoxi]-1-propanosulfonato de sodio, 3-((1-(furan-2-il)undeciloxi)carbonilamino)propano-1-sulfonato de sodio y 3-(4-(1,1-bis(hexiloxi)etil)piridinio-1-il)propano-1-sulfonato de sodio. En una realización más preferida, el tensioactivo es 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio. En general, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura y durante un tiempo suficientes para desnaturalizar y alquilar la mezcla de TNFR2:Fc aplicada en la etapa (a). Por ejemplo, la etapa (b) puede llevarse a cabo a de 40 a 70°C durante de 30 a 60 min. En una realización preferida, la etapa (b) puede llevarse a cabo a de 50 a 60°C durante de 30 a 45 min.

La digestión en la etapa (c) se lleva a cabo usando una cantidad eficaz de tripsina y aplicando un tiempo suficiente y una temperatura apropiada en condiciones que facilitan la digestión. Por ejemplo, la digestión trípica puede llevarse a cabo en un tampón adecuado durante 1-24 h, preferiblemente durante 6-18 h; y a 32-38°C, tal como a 36-37°C. En muchos casos las condiciones de tampón en la etapa (b) no serán adecuadas para la etapa (c). En estos casos, la etapa (c) puede comprender intercambiar el tampón de la muestra obtenida de la etapa (b) a un tampón de digestión adecuado antes de la digestión. Preferiblemente, dicho tampón de digestión tiene un pH en el intervalo de 5 a 7, más preferiblemente en el intervalo de 5,5 a 6,5. Los tampones de digestión adecuados incluyen tampones de digestión que comprenden MES como agente tamponante, por ejemplo en una concentración de MES 10-100 mM, más preferiblemente MES 30-60 mM. Además del agente tamponante, el tampón de digestión puede comprender también un tensioactivo escindible. El tensioactivo escindible puede ser el mismo que se usó en la etapa (b) o puede ser un tensioactivo escindible diferente. Por consiguiente, el tensioactivo escindible puede seleccionarse de 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio, 3-((1-(furan-2-il)undeciloxi)carbonilamino)propano-1-sulfonato de sodio y 3-(4-(1,1-bis(hexiloxi)etil)piridinio-1-il)propano-1-sulfonato de sodio. En una realización más preferida el tensioactivo es 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio. Si está presente, los tampones de digestión comprenden el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible, preferiblemente el 0,1%-0,2% de tensioactivo escindible. Finalmente, la etapa (c) puede terminarse mediante la adición de ácido fórmico al 1% en acetonitrilo al 10%. El experto en la técnica observará que esta digestión se realiza en condiciones no reductoras.

En la tabla 2, se enumeran todos los fragmentos que se obtienen en una digestión trípica de una TNFR2:Fc preferida, concretamente etanercept, en condiciones reductoras (!).

Tabla 2

Péptido n.º	N.º de aminoácido	SEQ ID NO:	Secuencia
T1	1-19	6	LPAQVAFTPYAPEPGSTCR
T2	20-21		LR
T3	22-34	7	EYYDQTAQMCCSK
T4	35-42	8	CSPGQHAK
T5	43-47	9	VFCTK
T6	48-77	10	TSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSR
T7	78-90	4	CSSDQVETQACTR
T8	91-94	11	EQNR
T9	95-108	12	ICTCRPGWYCALSK
T10	109-113	13	QEGCR

ES 2 733 298 T3

T11	114-119	14	LCAPLR
T12	120-120		K
T13	121-185	15	CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSENNTSSSTDICRPHQICN VVAIPGNASMDAVCTSTSPTR
T14	186-201	16	SMAPGAVHLPQPVSTR
T15	202-238	17	SQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGSTGDEPK
T16	239-242	18	SCDK
T17	243-268	19	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
T18	269-275	20	DTLMISR
T19	276-294	21	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
T20	295-308	22	FNWYVDGVEVHNAK
T21	309-312	23	TKPR
T22	313-321	24	EEQYNSTYR
T23	322-337	25	WSVLTVLHQDWLNGK
T24	338-340		EYK
T25	341-342		CK
T26	343-346	26	VSNK
T27	347-354	5	ALPAPIEK
T28	355-358	27	TISK
T29	359-360		AK
T30	361-364	28	GQPR
T31	365-375	29	EPQVYTLPPSR
T32	376-380	30	EEMTK
T33	381-390	31	NQVSLTCLVK
T34	391-412	32	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
T35	413-429	33	TTPPVLDSDGSFFLYSK
T36	430-434	34	LTVDK
T37	435-436		SR
T38	437-459	35	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
T39	460-467	36	SLSLSPGK

5 Teniendo en consideración la formación de puentes disulfuro de etanercept mostrada en la tabla 1, el experto en la técnica se dará cuenta inmediatamente de que en condiciones no reductoras tal como se proporcionan en el método de determinación de la presente invención, por ejemplo los fragmentos individuales T1 (aa 1-19) y T3 (aa 22-34) no se obtendrán en moléculas de TNFR2:Fc con un puente disulfuro Cys18-Cys31 intacto ya que están todavía unidos covalentemente por este puente disulfuro. De manera similar, el fragmento T7 (aa 78-90) no se obtendrá a partir de moléculas de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys74-Cys88 y/o Cys78-Cys96 intactos. Sin embargo, si Cys78 está formando un puente disulfuro con Cys88, se obtendrá un fragmento correspondiente a los aminoácidos 78-90 de TNFR2:Fc.

10 Entonces, la muestra resultante de la etapa (c) se somete a HPLC, separando de ese modo los fragmentos individuales obtenidos en la digestión triptica. En particular, según el método presentado en el presente documento, fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys78-Cys88 de los otros fragmentos, en particular de fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys74-Cys88 y/o Cys78-Cys96. Los fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys78-Cys88 consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7", véase también anteriormente la tabla 2).

Asimismo, la presente divulgación proporciona un método de purificación de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆, en el que el método comprende

5 someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y

separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica;

10 en el que la cantidad de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ se determina usando un método tal como se da a conocer en el presente documento.

En una realización preferida de estos métodos, la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

15 La disolución que comprende la TNFR2:Fc en bruto se somete habitualmente a cromatografía de afinidad como primera etapa. El término "someter una disolución que comprende dicha TNFR2:Fc a cromatografía de afinidad" tal como se usa en el presente documento pretende indicar que la cromatografía de afinidad es específica para la TNFR2:Fc, es decir esencialmente sólo la TNFR2:Fc se une en primer lugar a una resina por medio de una interacción que es específica para la TNFR2:Fc, luego la resina se lava habitualmente, tras lo cual la TNFR2:Fc se eluye de la resina aplicando condiciones adecuadas. Las resinas de afinidad pueden eluirse cambiando las 20 concentraciones de sal, pH, pl, carga y fuerza iónica en una o más etapas o a través de un gradiente para resolver la TNFR2:Fc.

La resina es normalmente una matriz de gel, a menudo de agarosa, que se ha modificado con el fin de proporcionar una interacción específica con TNFR:Fc.

25 Por ejemplo, la cromatografía de afinidad puede llevarse a cabo en una resina modificada con proteína A, proteína G, un anticuerpo capaz de unirse a la parte de Fc de dicha TNFR2:Fc o un anticuerpo dirigido con la parte de TNFR2 de dicha TNFR2:Fc. Preferiblemente dicha resina está modificada con proteína A o proteína G, y más preferiblemente, dicha resina está modificada con proteína A. La proteína A es una proteína originalmente encontrada en la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a IgG1 e IgG2 humanas así como IgG2a e IgG2b de ratón. Además, la proteína A se une con afinidad moderada a IgA, IgE e IgM humanas así como a IgG3 e IgG1 de ratón. No reacciona con IgD o IgG3 humanas, o IgA, IgE y IgM murinas. Alternativamente, 30 pueden usarse otras proteínas bacterianas de unión a Fc tales como proteína G o proteína A/G. La proteína G tiene una afinidad de unión a IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, y a IgG2a e IgG2b murinas que es comparable a la proteína A. Sin embargo, la proteína G también se une a IgG3 humana e inmunoglobulinas de rata, y su afinidad de unión a IgG1 e IgG3 murina aumenta en comparación con la proteína A. La proteína G presenta una afinidad aparente con 35 IgA, IgD, IgE o IgM. La proteína A/G es una proteína de fusión recombinante de tanto proteína A como proteína G.

La unión de la proteína A/G es menos dependiente del pH que la proteína A, se une a todas las subclases de IgG humana y de ratón, se une a IgA, IgE, IgM humanas y (en un menor grado) a IgD, pero no se une a IgA o IgM de ratón. Una resina de proteína A adecuada particular es la resina MabSelect SuRe (GE Healthcare). Dicha resina tiene un tamaño de partícula medio de 85 µm y una capacidad de carga de 15-22 g/l de resina. Si la parte de Fc de TNFR2:Fc no reacciona con la proteína A, proteína G o proteína A/G, pueden usarse anticuerpos que son 40 específicos para dicha parte de Fc o la parte de TNFR2. A los expertos en la técnica se les ocurrirán anticuerpos adecuados y están disponibles comercialmente.

La unión de la TNFR2:Fc a la resina o matriz de afinidad se produce habitualmente a pH 6-8, preferiblemente a pH 6,5-7,5, y más preferiblemente a aproximadamente pH 7,0. Por tanto, puede ser necesario ajustar el pH de la disolución antes de la unión a la resina de afinidad. En una realización preferida, la resina que tiene unida dicha TNFR2:Fc se lava entonces con uno o más tampones adecuados.

45 Tales tampones pueden comprender por ejemplo fosfato de sodio 5-50 mM, cloruro de sodio 20-200 mM pH 6-8; o un tampón fosfato o un tampón citrato o un tampón acetato o una mezcla de estos tampones con una molaridad total de 1-100 mM, preferiblemente 5-50 mM con cloruro de sodio 0-750 mM, pH 5-6,5; o tampones de lavado de 50 cromatografía de afinidad descritos en la técnica.

La elución de TNFR2:Fc la matriz de afinidad se lleva a cabo preferiblemente aplicando condiciones ácidas tales como un pH que oscila entre 2,5 y 4,5, más preferiblemente aplicando un pH que oscila entre 3,0 y 3,5. En determinados casos, es deseable aplicar un gradiente que comienza a partir del pH superior hacia valor de pH inferior. La elución puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un tampón que comprende un tampón basado en 55 ácido acético, ácido cítrico y/o ácido fosfórico a concentraciones de 1-100 mM, preferiblemente 5-50 mM.

Parámetros adicionales, tales como velocidad de flujo, altura de lecho de la columna, etc. tendrán que determinarse caso a caso usando métodos de rutina. Sin embargo, para ese fin, se apreciará que se conocen bien en la técnica procedimientos cromatográficos de afinidad.

5 En una realización preferida, la al menos una etapa cromatográfica comprende además una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico, que se realizan preferiblemente antes de la etapa de HIC.

Por ejemplo, puede aplicarse una etapa de intercambio catiónico. En particular si un método contiene dos etapas cromatográficas de intercambio iónico, es una práctica general aplicar al menos una etapa cromatográfica de intercambio iónico.

10 En una realización más preferida, la TNFR2:Fc se somete a una o más etapas de cromatografía de intercambio aniónico tras la cromatografía de afinidad, que permite la separación y purificación de moléculas basándose en su carga. La cromatografía de intercambio aniónico también puede usar una matriz de cromatografía multimodal (MMC), tal como una disponible comercialmente de GE Healthcare con el nombre comercial Capto adhere. La cromatografía de intercambio aniónico puede llevarse a cabo en el modo de unión/elución o modo de flujo pasante o ambos. En determinados casos, puede preferirse que la cromatografía de intercambio aniónico se lleve a cabo en primer lugar en el modo de unión/elución seguido por una segunda etapa de intercambio aniónico en el modo de flujo pasante.

Meramente como ejemplo, a continuación se describe una etapa de cromatografía de intercambio aniónico clásica en el modo de unión/elución.

20 La TNFR2:Fc se une a la resina de intercambio aniónico a pH 7-8, preferiblemente a pH 7,3-7,7. Una vez que TNFR2:Fc está unida a la resina de intercambio aniónico, dicha resina se lava con un tampón a pH 7-8, un tampón de lavado apropiado puede ser un tampón fosfato, por ejemplo, un tampón que comprende fosfato de sodio 1-50 mM. La elución puede lograrse usando un tampón, tal como un tampón fosfato, citrato o acetato, o una mezcla de los mismos, por ejemplo que comprende fosfato de sodio 1-50 mM, que tiene una concentración de sal que altera la interacción iónica entre la TNFR:Fc y la resina de intercambio aniónico, por ejemplo, cloruro de sodio 100-200 mM.

25 Meramente como ejemplo, a continuación se describe una etapa de cromatografía de intercambio aniónico multimodal en el modo de flujo pasante.

30 Para lograr los mejores resultados, la conductividad de la disolución que contiene TNFR2:Fc se ajusta a 20-60 mS/cm, preferiblemente a 25-46 mS/cm; y a pH 5,5-6,5, preferiblemente a pH 5,5-6,2. El tampón puede ser un tampón fosfato, citrato o acetato, o una mezcla de los mismos, por ejemplo un tampón que comprende fosfato de sodio, citrato de sodio o acetato de sodio 1-50 mM; y cloruro de sodio 200-700 mM, preferiblemente cloruro de sodio 250-600 mM.

La(s) fracción/fracciones obtenida(s) tras la(s) etapa(s) de cromatografía de intercambio aniónico que comprende(n) la TNFR:Fc podría(n) someterse entonces a una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

35 Tal como se estableció anteriormente, el método de purificación comprende al menos una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). A altas concentraciones de sal, grupos no polares en la superficie de la proteína interaccionan con los grupos hidrófobos, por ejemplo grupos octilo o fenilo, de la resina de HIC. Resinas de HIC útiles particulares están disponibles comercialmente, Pheny Sepharose HP (GE Healthcare) y Toyopearl Phenyl 650, por ejemplo Toyopearl Fenilo 650 (M). Puesto que los efectos hidrófobos aumentan por el aumento de la fuerza iónica, el eluyente es normalmente un tampón acuoso con concentraciones de sal decrecientes, concentraciones crecientes de detergente (que altera las interacciones hidrófobas) y/o cambios en el pH. En una realización preferida, la HIC se lleva a cabo en un tampón que tiene un pH que oscila entre 5,5-6,5, preferiblemente pH 5,8-6,5, tal como un pH de 6,0.

45 Además, antes de la unión de la TNFR2:Fc a la resina de HIC, puede ser necesario ajustar la(s) fracción/fracciones que comprende(n) la TNFR2:Fc, de modo que la conductividad de la disolución esté en el intervalo de 50-100 mS/cm, preferiblemente 70-85 mS/cm. Esto puede lograrse, por ejemplo, diluyendo la(s) fracción/fracciones que comprende(n) la TNFR2:Fc con un tampón citrato de sodio, fosfato de sodio o acetato de sodio que comprende además sulfato de sodio a concentraciones de o por encima de sulfato de sodio 1 M.

50 Tras la carga de la TNFR2:Fc, la resina de HIC se lava con un tampón adecuado. Por ejemplo, la resina puede lavarse con un tampón de lavado que comprende citrato de sodio, fosfato de sodio o acetato de sodio 50-150 mM, preferiblemente citrato de sodio o fosfato de sodio 50-100 mM; y una concentración apropiada de sulfato de sodio. En una realización preferida, la resina se lava con un tampón de lavado que comprende fosfato de sodio 100 mM y sulfato de sodio 0,6 M; fosfato de sodio 50 mM y sulfato de sodio 0,8 M; fosfato de sodio 50 mM y sulfato de sodio 0,95 M; o citrato de sodio 50 mM y sulfato de sodio 0,8 M. La concentración del tampón y/o del sulfato de sodio puede elegirse como un gradiente, o puede ser cada una única concentración que se encuentra dentro de los intervalos anteriores.

55

- En el caso de que la elución vaya a lograrse disminuyendo la concentración de sal, la TNFR2:Fc puede eluirse aplicando un gradiente del 0-100% de dicho tampón de lavado a un tampón de elución que tiene una concentración inferior de iones. Por ejemplo, el tampón de elución puede ser un tampón citrato, fosfato o acetato, preferiblemente el mismo sistema de tampón usado en dicho tampón de lavado. Más preferiblemente, el tampón de elución comprende citrato de sodio, fosfato de sodio o acetato de sodio 1-100 mM, preferiblemente citrato de sodio o fosfato de sodio 10-50 mM; y sulfato de sodio 0-100 mM, y más preferiblemente sulfato de sodio 0-10 mM. Basándose en los datos reales con respecto al rendimiento y la bioactividad para las fracciones eluidas obtenidas, el experto en la técnica puede seleccionar una ventana de elución óptima, que representa el mejor compromiso de rendimiento, pureza y bioactividad.
- Con el uso de una etapa de HIC, el grado de pureza de la muestra, tal como se determina mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) puede aumentarse hasta valores por encima del 90%, preferiblemente por encima del 92%, incluso más preferiblemente por encima del 95%. En particular, esta etapa de HIC permite la reducción de impurezas relacionadas con el producto, tales como productos de degradación (DP) de TNFR2:Fc, productos de agregación (AP) de TNFR2:Fc, dímeros o proteínas TNFR:Fc procesados erróneamente, proteínas TNFR:Fc plegadas erróneamente o dímeros o proteínas TNFR:Fc con formación de puentes disulfuro intercatenarios y/o intracatenarios erróneos. El experto en la técnica entiende que la formación de puentes disulfuro erróneos y el plegamiento erróneo pueden ser mutuamente dependientes y/o sinérgicos. Específicamente, la etapa de HIC puede usarse para reducir la cantidad de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈.
- En realizaciones adicionales preferidas, el método puede comprender además una etapa, en la que el eluato de la etapa de HIC se somete a nanofiltración, ultrafiltración y/o diafiltración, con el fin de separar cualquier virus inactivado u otros contaminantes de la disolución purificada y/o transferir la TNFR2:Fc purificada a un tampón más adecuado con el fin de hacer que la TNFR2:Fc esté lista para su procesamiento adicional. Por ejemplo, la TNFR2:Fc purificada puede formularse para dar una composición farmacéutica.
- Sin embargo, el porcentaje de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ es también dependiente de las condiciones durante la producción (es decir, fermentación) de la TNFR2:Fc. Por tanto, también se proporciona un método que comprende
- (a) producir una composición que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una célula huésped adecuada; y
- (b) purificar la combinación obtenida de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ mediante el método de purificación tal como se describió anteriormente.
- En una realización preferida, la TNFR2:Fc se produce usando una célula huésped CHO. El proceso de producción de cultivo de células CHO que producen TNFR2:Fc se basa en cuatro fases:
1. Fase de inoculación: Tras descongelar un vial de banco de células, el cultivo se expande en una serie de frascos de agitación de tamaño creciente para generar suficiente suspensión celular para iniciar el primer biorreactor.
 2. Fase de expansión: Tras el tren de inóculos, se ejecutan uno más cultivos de fase previa de biorreactor para expandir adicionalmente el cultivo antes de iniciar la producción en el biorreactor final. El parámetro clave 'pH' es un punto de ajuste controlado durante esta fase de expansión. Durante ambas fases, de inóculo y de expansión, el cultivo se mantiene en la fase de crecimiento exponencial controlando adecuadamente las densidades celulares de transferencia y de siembra.
 3. Fase de producción: Se aplica un procedimiento de producción de cultivo celular discontinuo, de alimentación discontinua o de perfusión. Si la temperatura de cultivo celular original es superior, por ejemplo 37°C, la temperatura puede reducirse durante la fase de producción, por ejemplo hasta 30,5-36,5°C, preferiblemente hasta 30,5-35°C, más preferiblemente hasta una temperatura de 31-34°C, incluso más preferiblemente hasta una temperatura de 31,5-33°C, y lo más preferiblemente a una temperatura de 31,5-32,5°C. Sin embargo, es igualmente viable mantener la temperatura de manera constante en los intervalos anteriores ya desde el comienzo de la fase de producción.
 4. Clarificación: Tras el final de la fase de producción, se inicia la cosecha. Las células se separan mediante centrifugación seguido por filtración para eliminar residuos.
- El procedimiento de CHO que producen TNFR2:Fc puede ejecutarse con el mismo o diferente medio para las fases de inoculación, expansión y producción. En la técnica se conocen medios adecuados para la producción de glicoproteínas en células CHO y se dan a conocer por ejemplo en los documentos US 6.048.728, WO 2011/134920 y WO 2011/134921. Preferiblemente, todos los medios y, si emplea, cualquier alimentación están químicamente definidos y libres de componentes animales.
- Tal como se explicó anteriormente, el pH y la temperatura son parámetros críticos para evitar la formación de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈.

5 Por tanto, en una realización preferida, la célula huésped en la etapa (a) se cultiva a una temperatura de 30,5-36,5°C durante la fase de producción; preferiblemente a una temperatura de 30,5-35°C, más preferiblemente a una temperatura de 31-34°C, incluso más preferiblemente a una temperatura de 31,5-33°C y lo más preferiblemente a una temperatura de 31,5-32,5°C. Además, dicha célula huésped se cultiva preferiblemente a un pH de 6,75-7,00 durante la fase de producción; preferiblemente a un pH de 6,80-6,95 y lo más preferiblemente a un pH de 6,85-6,90. Por ejemplo, el pH puede controlarse por medio de pCO₂ y/o una disolución de NaOH al 2%. En este contexto, véanse también los datos en la sección de ejemplos.

10 La composición de TNFR2:Fc, que puede obtenerse usando los métodos anteriores dados a conocer en el presente documento, es particularmente baja en TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total. Por tanto, la presente divulgación también proporciona una composición de TNFR2:Fc, en la que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, preferiblemente menos del 2,1%, preferiblemente menos del 2,0%, preferiblemente menos del 1,9%, preferiblemente menos del 1,8%, más preferiblemente menos del 1,7%, incluso más preferiblemente menos del 1,6% y lo más preferiblemente el 1,5% o menos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, determinado según el método usando integración de pico de T7 y T27 tal como se describió anteriormente.

20 Una composición de este tipo puede usarse en medicina tal como en un método de tratamiento de un sujeto, en el que la composición se administra al sujeto. Más específicamente, la composición tal como se da a conocer en el presente documento puede usarse en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis soriásica, artritis reumatoide, granulomatosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, alzheimer y cáncer; preferiblemente en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis soriásica y artritis reumatoide.

25 La invención se describe además mediante las siguientes realizaciones.

1. Un método para determinar la cantidad relativa de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que el método comprende las etapas de:

30 (a) proporcionar una muestra que comprende una mezcla de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ y TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆;

(b) desnaturalizar y alquilar la muestra de la etapa (a);

(c) someter la muestra resultante de la etapa (b) a digestión trípica en condiciones no reductoras;

35 (d) someter la muestra resultante de la etapa (c) a HPLC, separando de ese modo fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que dichos fragmentos consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7");

40 (e) realizar una integración de pico para el pico indicativo de fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7"), y para un pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 ("T27"), tal como se obtiene a partir de la etapa (d); en el que el pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro en absoluto y es indicativo de la TNFR2:Fc total en la muestra; y

(f) calcular la cantidad relativa según la fórmula (1)

$$\% \text{ rel. } (T7) = \frac{\text{área}(T7)}{\text{área}(T7) + \text{área}(T27)} \times 100 \quad (1)$$

45 en el que la secuencia de aminoácidos de la parte de TNFR2 de TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% de identidad con los aminoácidos 23-257 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

2. El método de la realización 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc aplicada a la etapa (a) tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (etanercept).
- 5 3. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un tampón que comprende yodoacetamida 0,5-1,5 M, preferiblemente yodoacetamida 0,9-1,2 M.
- 10 4. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un tampón que comprende el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible, preferiblemente el 0,1%-0,2%; en particular en el que el tensioactivo se selecciona de 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio, 3-((1-(furan-2-il)undeciloxi)carbonilamino)propano-1-sulfonato de sodio y 3-(4-(1,1-bis(hexiloxi)etil)piridinio-1-il)propano-1-sulfonato de sodio; más preferiblemente en el que el tensioactivo es 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio.
- 15 5. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un tampón que tiene un pH en el intervalo de 7 a 9, preferiblemente de 7,5 a 8,5, lo más preferiblemente de aproximadamente pH 8.
- 20 6. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un tampón TRIS, preferiblemente en un tampón que comprende TRIS 10-100 mM, más preferiblemente TRIS 20-80 mM.
7. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a de 40 a 70°C durante de 30 a 60 min, preferiblemente a de 50 a 60°C durante de 30 a 45 min.
- 25 8. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) comprende intercambiar el tampón de la muestra obtenida de la etapa (b) a un tampón de digestión adecuado.
9. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo en un tampón de digestión que tiene un pH en el intervalo de 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,5.
- 30 10. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo en un tampón de digestión que comprende MES como agente tamponante, preferiblemente en un tampón que comprende MES 10-100 mM, más preferiblemente MES 30-60 mM.
11. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo en un tampón de digestión que comprende el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible, preferiblemente el 0,1%-0,2%; en particular en el que el tensioactivo se selecciona de 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio, 3-((1-(furan-2-il)undeciloxi)carbonilamino)propano-1-sulfonato de sodio y 3-(4-(1,1-bis(hexiloxi)etil)piridinio-1-il)propano-1-sulfonato de sodio; más preferiblemente en el que el tensioactivo es 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio.
- 35 12. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo usando una cantidad eficaz de tripsina durante 1-24 h, preferiblemente durante 6-18 h; y a 32-38°, preferiblemente a 36-37°C.
13. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (c) se termina mediante la adición de ácido fórmico al 1% en acetonitrilo al 10%.
- 40 14. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa (d) se lleva a cabo en una fase móvil que comprende TFA al 0,05%-0,5% en agua, preferiblemente TFA al 0,1%-0,2% en agua.
15. Un método de preparación de una composición de TNFR2:Fc que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, en el que el método comprende
- 45 someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y
- separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica;
- 50 en el que dicha una o más fracciones comprenden menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, preferiblemente menos del 2,1%, preferiblemente menos del 2,0%, preferiblemente menos del 1,9%, preferiblemente menos del 1,8%, más preferiblemente menos del 1,7%, incluso más preferiblemente menos del 1,6% y lo más preferiblemente el 1,5% o menos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, tal como se determina usando un método según la realización 1.
16. Un método de purificación de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆, en el que el método comprende someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y

TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y

5 separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica;

en el que la cantidad de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ se determina usando un método según una cualquiera de las realizaciones 1-14.

17. El método de la realización 15 o 16, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende además una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico, que se realizan preferiblemente antes de la HIC.

10 18. El método de la realización 17, en el que la una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico son una o más etapas de cromatografía de intercambio aniónico.

19. El método de la realización 18, en el que al menos una de la una o más etapas de cromatografía de intercambio aniónico comprenden una cromatografía de intercambio aniónico multimodal.

15 20. El método de una cualquiera de las realizaciones 15-19, en el que el método comprende además una etapa cromatográfica de afinidad, preferiblemente usando proteína A o proteína G; realizándose dicha etapa cromatográfica de afinidad antes de cualquier otra etapa cromatográfica.

21. El método de una cualquiera de las realizaciones 15-20, en el que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

20 22. Un método que comprende

(a) producir una composición que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una célula huésped adecuada; y

(b) purificar la combinación obtenida de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ mediante el método de purificación de una cualquiera de las realizaciones 15-21.

25 23. El método de la realización 22, en el que dicha célula huésped se cultiva a una temperatura de 30,5-36,5°C durante la fase de producción; preferiblemente a una temperatura de 30,5-35°C, más preferiblemente a una temperatura de 31-34°C, incluso más preferiblemente a una temperatura de 31,5-33°C y lo más preferiblemente a una temperatura de 31,5-32,5°C.

30 24. El método de la realización 22 o 23, en el que dicha célula huésped se cultiva a un pH de 6,75-7,00 durante la fase de producción; preferiblemente a un pH de 6,80-6,95 y lo más preferiblemente a un pH de 6,85-6,90.

25. El método de una cualquiera de las realizaciones 22-24, en el que dicha célula huésped es una célula CHO.

35 26. Una composición de TNFR2:Fc, en la que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad; lo más preferiblemente el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, preferiblemente menos del 2,1%, preferiblemente menos del 2,0%, preferiblemente menos del 1,9%, preferiblemente menos del 1,8%, más preferiblemente menos del 1,7%, incluso más preferiblemente menos del 1,6% y lo más preferiblemente el 1,5% o menos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, determinado según el método tal como se define en la realización 5.

27. Composición tal como se define en la realización 26, para su uso en medicina.

40 28. Composición tal como se define en la realización 27, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis sorriásica, artritis reumatoide, granulomatosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, alzheimer y cáncer; preferiblemente en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis sorriásica y artritis reumatoide.

45 29. El método de una cualquiera de las realizaciones 15-21, en el que la purificación se realiza a gran escala (100 g de TNFR2:Fc o más).

A continuación, la presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

50 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Ilustración esquemática de TNFR2:Fc.

Figura 2: TNFR2:Fc (izquierda), TNF-alfa (derecha).

Figura 3: Complejo de TNFR2:Fc y TNF-alfa.

5 Figura 4: Representación estructural del dominio de receptor de TNF alfa N-terminal de TNFR2:Fc (véase también SEQ ID NO: 1). Los aminoácidos se indican mediante un código de una única letra. Los N-glicanos unidos a asparagina y los O-glicanos unidos a serina o treonina se indican gráficamente. Se muestra la formación de puentes disulfuro correctos mediante barras de color gris claro entre residuos de cisteína específicos.

10 Figura 5: Representación estructural de péptido T7 con puente disulfuro incorrecto (véase también SEQ ID NO: 4) y el péptido de referencia interno T27 (véase también SEQ ID NO: 5). Los aminoácidos se indican mediante un código de una única letra. El péptido T7 presenta un puente disulfuro aberrante entre las cisteínas 78 y 88 y su abundancia se correlaciona negativamente con la bioactividad. El péptido de referencia T27 no está implicado en la formación de puentes disulfuro.

Figura 6: Puentes disulfuro del receptor (estructura de rayos X tomada de "Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex." Mukai *et al.*, Sci Signal 3(148), ra83, noviembre de 2010; marcaje de puentes y texto añadido).

15 Figura 7: Datos representativos que muestran la cantidad relativa de T7 determinada según el método usando integración de pico de T7 y T27 tal como se describió anteriormente en diferentes muestras con niveles variables de bioactividad. La potencia en el eje y se determinó usando un ensayo de gen indicador, los valores son valores arbitrarios. Se analizaron muestras de diferente calidad y se determinó la correlación basándose en todos los puntos de datos mostrados.

20 **Descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1

(receptor de TNF humano tipo 2; CD120b; p75/80; sec. de ref. (proteína): NP_001057)

MAPVAVWAAL	AVGLELWAAA	HALPAQVAF	PYAPEPGSTC	RLREYYDQTA	QMCCSKCSPG	60
QHAKVFCTKT	SDTVCDSCED	STYTQLWNWV	PECLSCGSRC	SSDQVETQAC	TREQNRICTC	120
RPGWYCALSK	QEGCRLCAPL	RKCRPGFGVA	RPGTETS DVV	CKPCAPGTFS	NTTSSTDICR	180
PHQICNVVAI	PGNASMDAVC	TSTSPTRSMA	PGAVHLPQPV	STRSQHTQPT	PEPSTAPSTS	240
FLLPMGSPSP	AEGSTGDFAL	PVGLIVGVTA	LGLLIIGVVN	CVIMTQVKKK	PLCLQREAKV	300
PHLPADKARG	TQGPEQQHLL	ITAPSSSSSS	LESSASALDR	RAPTRNQPQA	PGVEASGAGE	360
ARASTGSSDS	SPGGHGTQVN	VT CIVNV CSS	SDHSSQCSSQ	ASSTMGDTDS	SPSESPKDEQ	420
VPFSKEECAAF	RSQLETPETL	LGSTEEKPLP	LGVPDAGMKP	S		461

SEQ ID NO: 2 (dominio constante de cadena pesada de clase IgG1 humana)

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

SEQ ID NO: 3 (Etanercept)

LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTSV TVCDSCEDST	60
YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK	120
CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFNSV TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS	180
TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC	240
DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD	300
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK	360
GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL	420
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK	467

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Determinación de la cantidad relativa de T7

10 TNFR2:Fc es una proteína de fusión compuesta por un dominio de anticuerpo Fc C-terminal y un dominio 2 de receptor de TNF alfa N-terminal. La estructura del dominio 2 de receptor de TNF alfa es crítica para la bioactividad de este compuesto biofarmacéutico y es altamente compleja conteniendo múltiples O-glicanos, dos N-glicanos y once puentes disulfuro (véanse también las figuras 4 y 6). Pudo mostrarse que existe al menos una forma variante de la molécula en la sustancia farmacológica de TNFR2:Fc final como resultado de una formación de puentes disulfuro diferente.

15 Al digerir muestras de TNFR2:Fc con tripsina en condiciones no reductoras, la proteína puede escindirarse para dar componentes más pequeños, mientras que las estructuras de puentes disulfuro permanecen intactas. La dilucidación de los péptidos usando análisis de RP-HPLC-EM verificó la presencia de los péptidos con puentes correctos esperados así como un péptido denominado T7, que se mostró que contiene un puente disulfuro aberrante entre las cisteínas 78 y 88 (véanse las figuras 5 y 6, y la tabla 2 anteriormente). Aunque se encontró que la abundancia de algunas estructuras con puentes correctos se correlacionada con una bioactividad aumentada, su diversidad y perfiles de elución complejos impidieron su uso como indicadores estables de bioactividad usando un enfoque de CL-UV/Vis. Sin embargo, el péptido T7 con puentes incorrectos presentó una correlación estable con bioactividad reducida. Se muestran datos representativos en la figura 7, demostrando la fuerte correlación entre la bioactividad y la cantidad relativa de T7 determinada según el método usando integración de pico de T7 y T27 tal como se describió anteriormente.

La cantidad relativa de T7 puede determinarse tal como sigue.

5 Todas las muestras se descongelan a temperatura ambiente. Todas las etapas de centrifugación se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada (por ejemplo, centrífuga Eppendorf 5804R; Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Normalmente se usan aproximadamente 80-300 µg, preferiblemente 100-200 µg de proteína por muestra. Con el fin de adaptar el tampón, puede ser necesario concentrar las muestras hasta una concentración de proteína apropiada, por ejemplo usando un dispositivo de concentración tal como Vivaspin 500, 10 kDa, n.º de art. de Sartorius: VS0102. A las muestras o sus concentrados, se les añade tampón de lavado (TRIS 50 mM pH 8) hasta un volumen final de aproximadamente 200 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de disolución de desnaturalización. La disolución de desnaturalización se prepara mezclando 950 µl de RapiGest al 0,1% (Waters, n.º 186001861) en TRIS 50 mM pH 8 con 50 µl de yodoacetamida 1 M (Sigma, n.º I1149) en TRIS 50 mM pH 8. El reactivo se prepara directamente antes de su uso, y se cubre por ejemplo con papel de aluminio para protegerlo frente a la luz. Se eliminan las burbujas dando pequeños golpecitos y la muestra se incuba durante 40 min a 50°C (por ejemplo usando Thermomixer Comfort; Eppendorf Hamburgo, Alemania).

15 Se permite que las muestras se enfríen hasta temperatura ambiente y luego se intercambia el tampón hasta un volumen final de 20 – 40 µl de tampón de digestión (MES 50 mM (Sigma, M5287) en agua para HPLC pH 6). Entonces se transfiere cada muestra a un tubo de reacción con cierre de seguridad, y se añaden 25 µl de tampón de digestión 50 mM (MES 50 mM en agua para HPLC pH) + 25 µl de tampón de digestión con tensioactivo (RapiGest al 0,1% (Waters, n.º 186001861) en tampón MES 50 mM pH 6). Se añaden 12 µl de la tripsina 1 µg/µl recién reconstituida (Promega, tripsina Gold, calidad de espec. de masas, reconstituida con tampón MES 50 mM pH 6,0 directamente antes de su uso). La muestra se agita cuidadosamente moviendo suavemente, luego se centrifuga brevemente y se incuba durante 17 h a 37°C en un bloque de calentamiento (por ejemplo Thermomixer Comfort; Eppendorf Hamburgo, Alemania).

25 Tras la incubación, las muestras se retiran del Thermomixer, y se añaden 49 µl de disolución de terminación (ácido fórmico al 1% (calidad de HPLC, por ejemplo, ThermoScientific, n.º 40967) en acetonitrilo al 10% (acetonitrilo de calidad de HPLC ≥ 99,9%, por ejemplo Merck n.º (1.00030.2500)). Se mezcla suavemente mediante moviendo ligeramente. Las muestras se centrifugan durante aproximadamente 10 min a 16.000g y 6°C. Un sedimento ligeramente opaco puede ser apenas visible tras la centrifugación. Si la muestra es todavía opaca tras esta primera centrifugación, se repite la centrifugación. Entonces se transfiere el sobrenadante a un vial de vidrio de inyector automático de 300 µl, se añade agua hasta un volumen global de aproximadamente 236 µl y se colocan las muestras en un inyector automático enfriado.

35 Se lleva a cabo HPLC usando un cromatógrafo de líquidos con un detector UV (por ejemplo sistema 1200SL serie LC con desgasificador en línea (G1322A), módulo de bomba binaria (G1312), inyector automático termostatzado (G1329A/G1330A), departamento de columna termostatzado (G1316A), detector de VWD (G1314A); todos de Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y una columna adecuada (por ejemplo, Ascentis Express Peptide ES-C18, 2,1 mm de DI x 15 cm de L n.º de cat. 53307-U; Supelco). Se usan los siguientes parámetros:

Tiempo de ejecución:	45 min
Velocidad de flujo:	0,8 ml/min
Compresibilidad bomba izquierda	46
Compresibilidad bomba derecha	115
Temperatura de la columna:	60°C (= punto de ajuste)
Volumen de inyección:	50 µl
Temperatura del inyector automático:	2 – 10°C
Detector UV:	Longitud de onda: 215 nm Anchura de pico: 0,025 min
Detector MWD/DAD:	Longitud de onda: 215 nm Anchura de pico: 0,03 min Anchura de banda: 4 nm Sin referencia Anchura de rendija: 4 nm
Fase móvil A	TFA al 0,1% (grado de HPLC, Fluka n.º 40967) en agua de HPLC
Fase móvil B	TFA al 0,1% en el 90% de acetonitrilo y el 10% de agua de HPLC
Gradiente	

Tabla 3

Tiempo [min]	% de B	Velocidad de flujo [ml/min]
0,0	0	0,8
2,5	0	0,8
25	16	0,8
28	18	0,8
33	100	0,8
37	100	0,8
40	0	0,8
45	0	0,8

Para comprobar la transferencia, pueden inyectarse muestras de blanco (fase móvil A) cada por ejemplo 10 inyecciones.

- 5 La integración de los cromatogramas se realiza usando un sistema de datos de cromatografía adecuado, por ejemplo Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La cantidad relativa de péptido T7 se calcula según la siguiente ecuación (fórmula (1)):

$$\% \text{ rel. (T7)} = \frac{\text{área(T7)}}{\text{área(T7)} + \text{área(T27)}} \times 100 \quad (1)$$

Área (T7): área de pico de T7
 Área (T27): área de pico de T27

- 10 Para garantizar que se aplicó la cantidad apropiada de muestra sobre la columna, se compara el área de pico T27 en unas muestras dadas con el área de pico promedio de una inyección de sustancia de referencia. Los cálculos se realizan según la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad de muestra aplicada [\%]} = \frac{a_{\text{muestra}}}{a_{\text{referencia}}} * 100$$

a_{muestra} área de pico de T27 de la muestra de TNFR:Fc

$a_{\text{referencia}}$ área de pico de T27 promedio de las inyecciones de sustancia de referencia de TNFR:Fc

- 15 Todas las sustancias eran de grado de Ph. Eur. o de calidad comparable. Los tampones se prepararon con agua purificada y desionizada. Los proveedores y números de orden de instrumentos, materiales y reactivos indicados se facilitan como ejemplos. Estos productos pueden considerarse intercambiables con productos comparables de la misma o mejor calidad.

- 20 Lo más notablemente, las cantidades relativas de T7 encontradas en todos los lotes de EE.UU. y UE de Enbrel® examinados mostraron valores del 2,3% o superiores cuando se analizaron y calcularon según el método de determinación de la presente invención usando la señal del péptido T27 como pico de referencia, véase la tabla 5.

Tabla 4. Cantidades relativas de T7 en el producto de referencia Enbrel®

Lote	T7 [%]
N.º 1026663 (EE.UU.)	2,4
N.º F36988 (UE)	2,4
N.º F76195 (UE)	2,8
N.º 1028435 (EE.UU.)	2,3
N.º 1026662 (EE.UU.)	2,3
N.º F69006 (UE)	2,8

Esto demostró que los métodos de producción y purificación presentados en el presente documento son capaces de producir TNFR2:Fc y en particular etanercept a un nivel sin precedentes de cantidad de T7 reducida.

Ejemplo 2: Producción de TNFR2:Fc con cantidades variables de T7

5 Se sabe que las variantes con puentes incorrectos pueden formarse ya en el procedimiento anterior (USP) para la fabricación de TNFR2:Fc. Al analizar muestras de estudios de caracterización de procedimientos de DoE (diseño de experimentos), pudo mostrarse que la cantidad de variantes con puentes incorrectos puede verse influida al nivel de USP (véase la tabla 4). Los valores proporcionados se obtienen de un modelo estadístico. Las muestras de TNFR2:Fc tomadas para establecer este modelo se sometieron sólo a cromatografía de afinidad de proteína A y no se purificaron por medio de cromatografía de interacción hidrófoba. La cantidad relativa de T7 se determinó según el método usando integración de pico de T7 y T27 tal como se describe a continuación.

Tabla 5

		Intervalo de confianza del 95%				Intervalo de confianza del 95%	
pH	T7 [%]	límite bajo	límite alto	Temperatura [°C]	T7 [%]	límite bajo	límite alto
6,65	3,86	3,59	4,14	30,5	2,21	1,92	2,5
6,70	3,59	3,42	3,76	31,5	2,4	2,24	2,55
6,80	3,25	3,12	3,38	33,0	3,19	3,05	3,32
6,90	3,2	3,04	3,35	34,5	4,59	4,3	4,88
6,95	3,27	3,07	3,48	35,5	5,87	5,31	6,42

Ejemplo 3: Purificación de TNFR2:Fc

15 Durante el procesamiento posterior (DSP), las variantes con puentes incorrectos se agotan principalmente en la etapa de purificación de HIC, mientras que pequeñas cantidades pueden agotarse ya mediante una etapa de purificación de intercambio aniónico previa, tal como una etapa de purificación de MMC en modo de flujo pasante.

Cromatografía de afinidad (proteína A)

20 El procedimiento de purificación comienza a partir de sobrenadantes de cultivo libres de células. El material se filtró a través de 0,2 µm. Utilizando la parte de Fc de la proteína de fusión, se capturó TNFR:Fc mediante cromatografía de afinidad sobre resina de proteína A. La interacción de la proteína A con la parte de Fc es muy específica. Por tanto, la cromatografía de captura separa muy eficazmente proteínas de la célula huésped (HCP), ADN y virus del producto.

25 La temperatura del procedimiento era de 21°C. Se cargó el sobrenadante de cultivo celular sobre la resina MabSelect SuRe (GE Healthcare), se equilibró con tampón fosfato de sodio de pH 7,0 que comprende además cloruro de sodio 150 mM. Entonces, se lavó la columna con el mismo tampón hasta que UV280 retorna a la señal cercana al nivel inicial (de aproximadamente 2 a 6 volúmenes de columna).

30 Para aumentar la capacidad de eliminación de HCP de la etapa de captura, se introdujo una etapa de lavado adicional. Este tampón de lavado contenía acetato de sodio y cloruro de sodio 0-500 mM. Le siguió la elución del producto con un tampón ácido que tenía un pH de ~3,2. Se combinaron los eluatos y se procesaron para la siguiente etapa de purificación.

Cromatografía de intercambio aniónico (AEX)

El producto intermedio resultante de la etapa de cromatografía de afinidad se ajustó a pH 7,5 y se cargó sobre una resina Fractogel TMAE HiCap (M) (Merck). Posteriormente, se enjuagó la columna con tampón fosfato de sodio y finalmente se eluyó el producto con tampón fosfato de sodio que contenía cloruro de sodio 150 mM. Se combinaron los eluatos y se procesaron para la siguiente etapa de purificación.

5 Cromatografía MM (MMC)

Se ajustó la conductividad de los eluatos combinados de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico usando cloruro de sodio 4 M, y se ajustó el pH a pH 6,0 usando una disolución de ácido fosfórico de pH ≤ 2 . Entonces, se cargó el producto intermedio sobre resina Capto adhere (GE Healthcare), se equilibró con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 450 mM pH 6,0 y se lavó entonces la columna con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 450 mM pH 6,0. La fracción no retenida y el lavado temprano que comprende el producto se recogieron y agruparon.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Las fracciones agrupadas de la cromatografía MM se diluyeron con tampón citrato de sodio pH 6,0 que comprendía sulfato de sodio 1,4 M. La conductividad de la disolución era de aproximadamente 80 mS/cm. Entonces, se cargó la disolución sobre Toyopearl Phenyl 650 (M) y se equilibró con tampón citrato de sodio pH 6,0 que comprendía sulfato de sodio. Entonces se enjuagó la columna con el mismo tampón. Finalmente, se eluye la columna usando un gradiente del 0-100% desde el tampón de equilibración hasta el tampón de elución (citrato de sodio 25 mM pH 6,0).

Se determinó la pureza del producto usando cromatografía de exclusión molecular (SEC), y determinando la cantidad de ADN, proteínas de la célula huésped (HCP), proteína A y endotoxina. Además, se calculó el rendimiento de la etapa y el rendimiento total para cada etapa de purificación. La siguiente tabla 8 muestra datos obtenidos con el método descrito anteriormente durante al menos tres ejecuciones.

Tabla 6 Agotamiento de péptido T7 durante el procesamiento posterior

Lote	Etapas de purificación	T7 [%]	Potencia [unidades arbitrarias]
1	Prot. A	3,63	71
1	+ AEX + MMC	3,05	74
1	+ HIC	1,54	91
2	Prot A	3,44	72
2	+ AEX + MMC	3,16	75
2	+ HIC	1,23	93

Ejemplo 4: Estabilidad en condiciones de estrés

La aplicación de los métodos dados a conocer en el presente documento permite obtener preparaciones de TNFR:Fc comuna cantidad de T7 relativa disminuida en comparación con preparaciones de TNFR:Fc del estado de la técnica. La baja cantidad de T7 también se mantiene tras el tratamiento con estrés.

Tabla 7

Muestra n. ^o		T7 en relación con T27 (% de T7)
3	Formulación final	1,2
3	1 mes a 40°C	1,8
4	1 mes a 40°C	1,9

Lista de secuencias

- <110> Sandoz AG
- <120> Cuantificación de TNFR2:Fc plegado erróneamente
- <130> EPA-125449
- <160> 36
- <170> Patent In versión 3.5
- <210> 1

ES 2 733 298 T3

<211> 461
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60
 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95
 Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110
 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125
 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140
 Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

ES 2 733 298 T3

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
 420 425 430
 Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
 435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455 460

5 <210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 733 298 T3

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

ES 2 733 298 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Etanercept

10

<400> 3
 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60

ES 2 733 298 T3

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

ES 2 733 298 T3

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

5 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 4
 Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 1 5 10

15 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 5
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 1 5

25 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg

<210> 7

ES 2 733 298 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 7
 Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys
 1 5 10

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 8
 Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 1 5

15 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 9
 Val Phe Cys Thr Lys
 1 5

25 <210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10
 Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln
 1 5 10 15

30 Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg
 20 25 30

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 11
 Glu Gln Asn Arg
 1

40 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 12
 Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys
 1 5 10

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 13
 Gln Glu Gly Cys Arg
 1 5

55 <210> 14

ES 2 733 298 T3

<211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 14
 Leu Cys Ala Pro Leu Arg
 1 5
 <210> 15
 <211> 65
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15
 Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp
 1 5 10 15
 Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser
 20 25 30
 Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile
 35 40 45
 Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr
 50 55 60
 15 Arg
 65
 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16
 Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg
 1 5 10 15
 25 <210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 17
 Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr
 20 25 30
 Gly Asp Glu Pro Lys
 35
 <210> 18
 <211> 4
 35 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18
 Ser Cys Asp Lys
 1
 40 <210> 19
 <211> 26

ES 2 733 298 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

5 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25

<210> 20
<211> 7

10 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
1 5

15 <210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 21
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
1 5 10 15

Glu Val Lys

<210> 22
<211> 14

25 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
1 5 10

30 <210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 23
Thr Lys Pro Arg
1

40 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 24
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
1 5

<210> 25
<211> 16

50 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 26
 Val Ser Asn Lys
 1

 10 <210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 27
 Thr Ile Ser Lys
 1

 <210> 28
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 28
 Gly Gln Pro Arg
 1
 25
 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 29
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 1 5 10

 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 30
 Glu Glu Met Thr Lys
 1 5

 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*

 <400> 31
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 1 5 10

 50 <210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 55 <400> 32
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 1 5 10 15

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 20

ES 2 733 298 T3

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 33
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 1 5 10 15

 Lys
 10 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 34
 Leu Thr Val Asp Lys
 1 5

 <210> 35
 <211> 23
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 35
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 1 5 10 15
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20
 25

 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

 <400> 36
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la cantidad relativa de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que el método comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una muestra que comprende una mezcla de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ y TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆;
- (b) desnaturalizar y alquilar la muestra de la etapa (a);
- (c) someter la muestra resultante de la etapa (b) a digestión triptica en condiciones no reductoras;
- 10 (d) someter la muestra resultante de la etapa (c) a HPLC, separando de ese modo fragmentos indicativos de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, en el que dichos fragmentos consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7");
- 15 (e) realizar una integración de pico para el pico indicativo de fragmentos que consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 ("T7"), y para un pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 ("T27"), tal como se obtiene a partir de la etapa (d); en el que el pico no afectado por la formación de puentes disulfuro de Cys₇₄, Cys₇₈, Cys₈₈ y Cys₉₆ no se ve afectado por la formación de puentes disulfuro en absoluto y es indicativo de la TNFR:Fc total en la muestra; y
- (f) calcular la cantidad relativa según la fórmula (1)

$$x \text{ (en \%)} = \frac{[\text{área de T7}]}{[\text{área de T7}] + [\text{área de T27}]} \times 100 \quad (1)$$

- 20 en el que la secuencia de aminoácidos de la parte de TNFR2 de TNFR2:Fc tiene al menos el 97% de identidad con los aminoácidos 1-235 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc aplicada a la etapa (a) tiene al menos el 97% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 25 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un tampón que tiene un pH en el intervalo de 7 a 9, que comprende TRIS 10-100 mM, y/o yodoacetamida 0,5-1,5 M, y/o el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a de 40 a 70°C durante de 30 a 60 min.
- 30 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo en un tampón de digestión que tiene un pH en el intervalo de 5 a 7; y en el que el tampón de digestión comprende MES como agente tamponante; y/o el 0,02%-0,5% de un tensioactivo escindible.
6. Método según la reivindicación 3 o 5, en el que el tensioactivo se selecciona independientemente de 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-1-propanosulfonato de sodio, 3-((1-(furan-2-il)undeciloxi)carbonilamino)propano-1-sulfonato de sodio y 3-(4-(1,1-bis(hexiloxi)etil)piridinio-1-il)propano-1-sulfonato de sodio.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (c) se lleva a cabo usando una cantidad eficaz de tripsina durante 1-24 h y a 32-38°C.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (d) se lleva a cabo en una fase móvil que comprende TFA al 0,05%-0,5% en agua.
- 40 9. Método de purificación de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆, en el que el método comprende someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica; en el que la cantidad de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ se determina usando un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 45

10. Método que comprende

(a) producir una composición que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en una célula huésped adecuada; y

5 (b) purificar la combinación obtenida de TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ mediante el método de purificación según la reivindicación 9.

11. Composición de TNFR2:Fc, en la que la secuencia de aminoácidos de la TNFR2:Fc tiene al menos el 97% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que comprende menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, determinado según el método tal como se define en la reivindicación 1.

10 12. Composición según la reivindicación 11, que comprende menos del 1,6% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, determinado según el método tal como se define en la reivindicación 1.

15 13. Método de preparación de una composición de TNFR2:Fc según la reivindicación 11, en el que el método comprende someter una muestra que comprende TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ y TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ a al menos una etapa cromatográfica, en el que la al menos una etapa cromatográfica comprende una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); y separar una o más fracciones que comprenden TNFR2:Fc con puentes disulfuro Cys₇₄-Cys₈₈/Cys₇₈-Cys₉₆ que tienen una cantidad reducida de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ en comparación con la muestra sometida a dicha al menos una etapa cromatográfica; en el que dicha una o más fracciones comprenden menos del 2,2% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈ basándose en TNFR2:Fc total, tal como se determina usando un método según la
20 reivindicación 1.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha una o más fracciones comprenden menos del 1,6% de TNFR2:Fc con puente disulfuro Cys₇₈-Cys₈₈, tal como se determina usando un método según la reivindicación 1.

Fig. 1

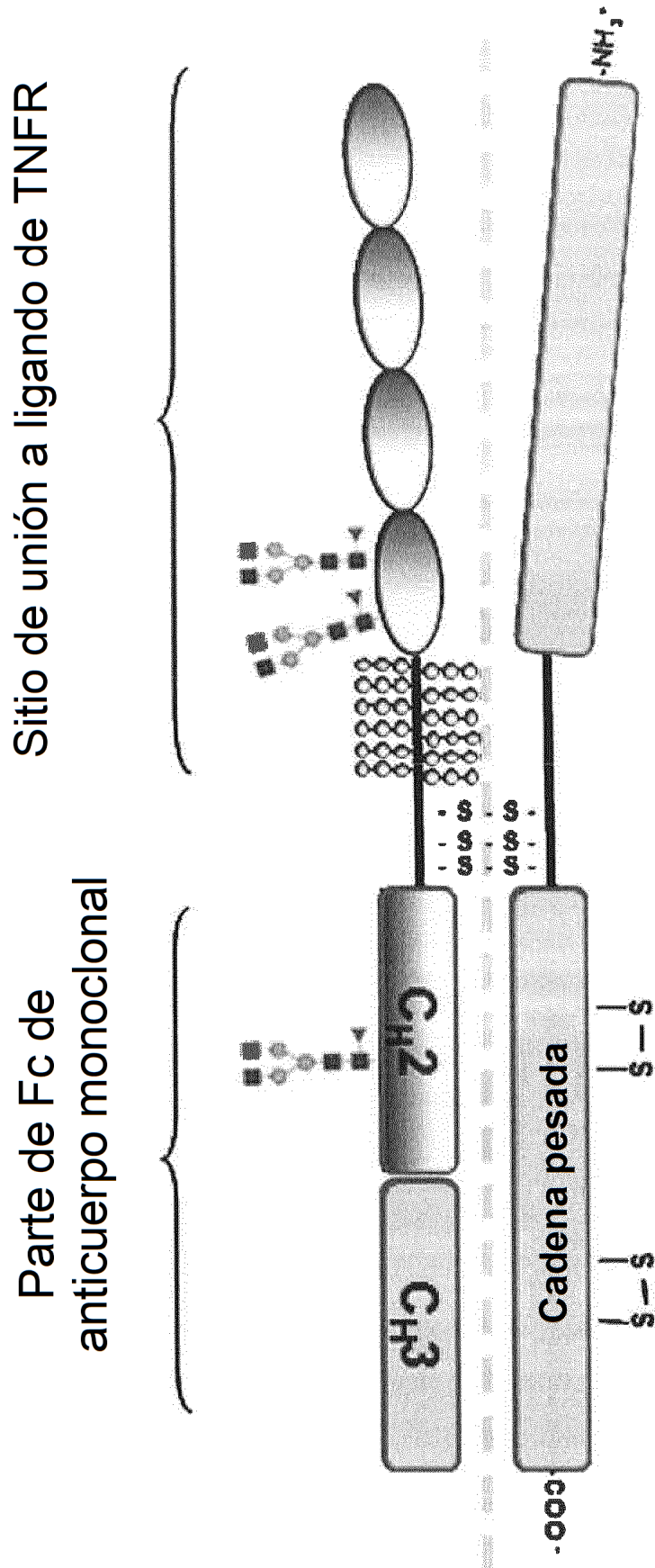


Fig. 2



Fig. 3

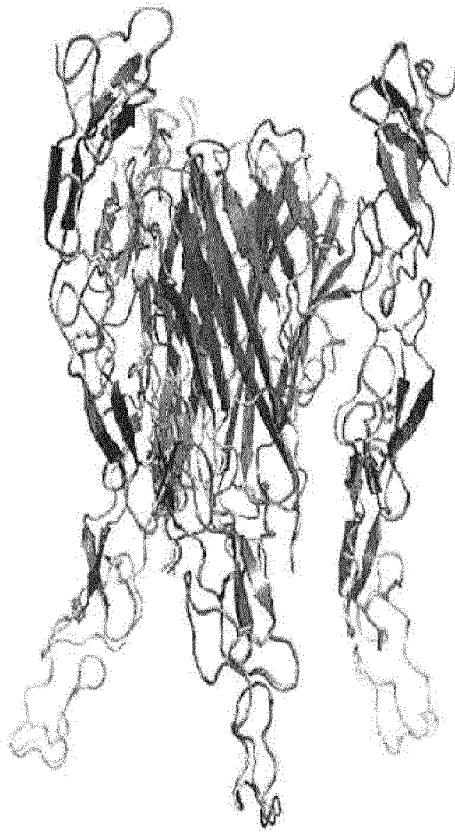


Fig. 4

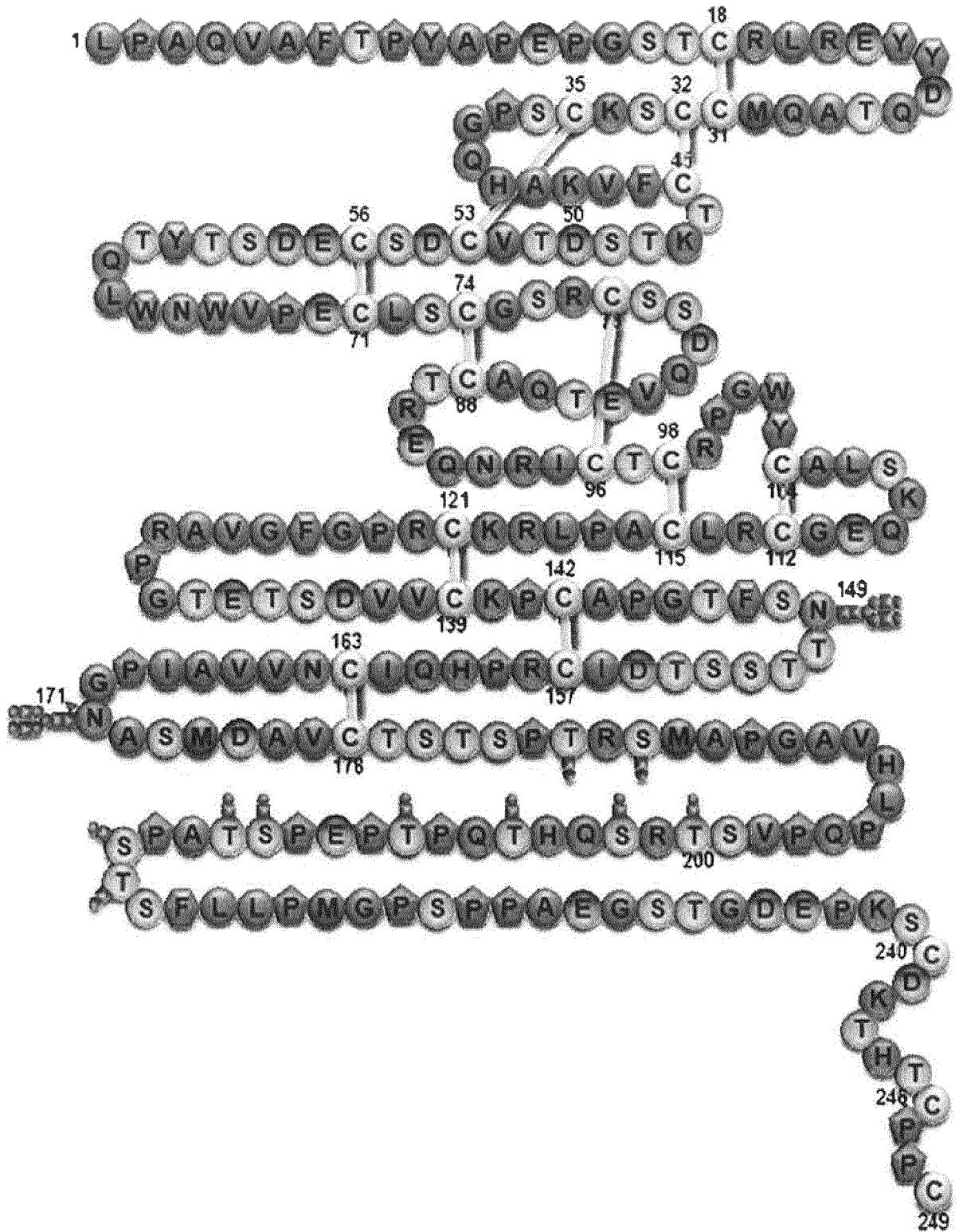


Fig. 5

T7 (puente disulfuro incorrecto Cys₇₈ - Cys₈₈)



T27 (péptido de referencia)



Fig. 6

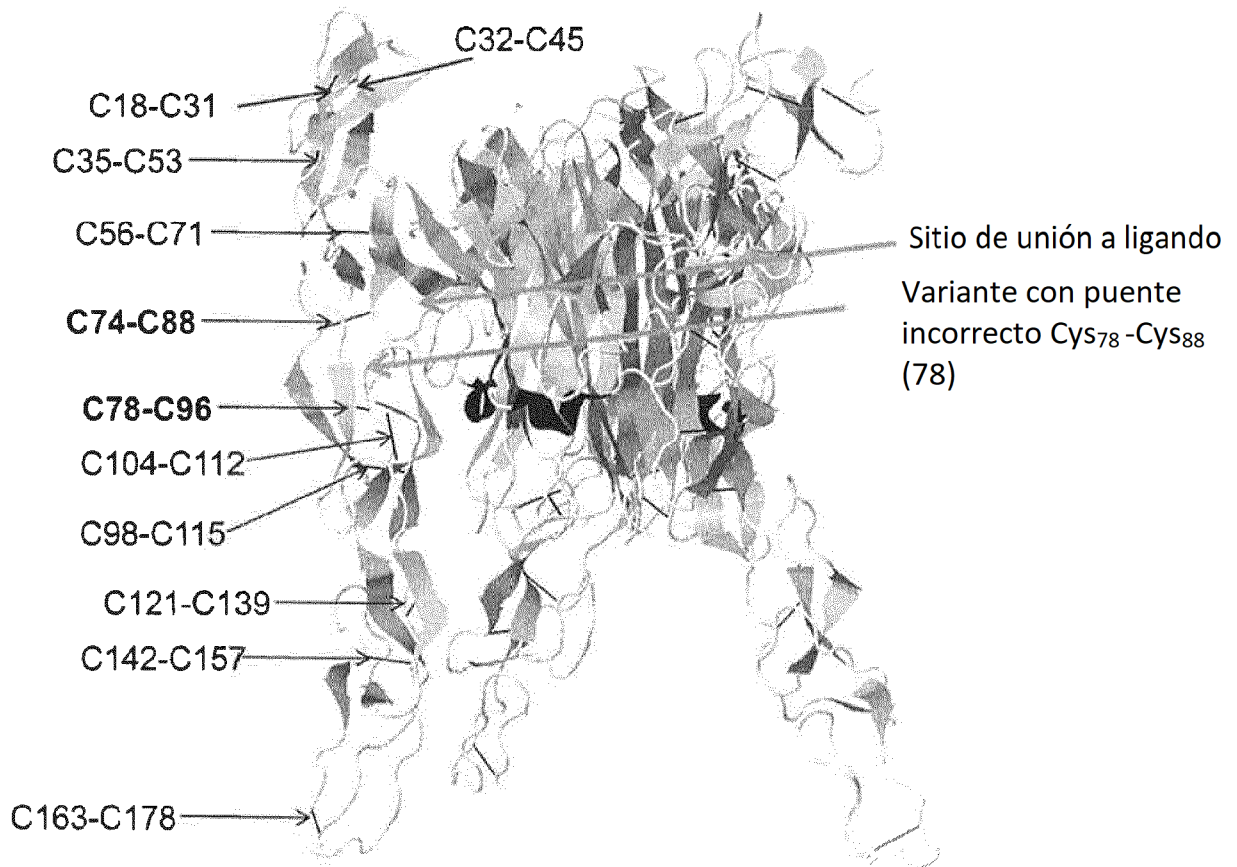


Fig. 7

