

C12N 9/64 (2013.01) **C07K 1/18** (2013.01)
C12N 15/57 (2013.01) **A61K 38/48** (2013.01)
B01J 41/00 (2013.01) **B01J 39/00** (2013.01)
B01D 15/36 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.05.21	(73) Titular(es): BAXTER INTERNATIONAL INC. ONE BAXTER PARKWAY DEERFIELD, IL 60015 US
(30) Prioridade(s): 2007.05.22 US 931301 P	BAXTER HEALTHCARE S.A. CH
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.24	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.04.10 075/2013	(72) Inventor(es): PETER TURECEK AT PETER MATTHIESSEN AT STEFAN ROMEDER-FINGER AT HANS-PETER SCHWARZ AT
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PREPARATIVO PARA A FURINA HUMANA**

(57) Resumo:

FURINA HUMANA TRUNCADA RECOMBINANTE FOI EXPRESSADA EM CÉLULAS CHO E CONCENTRADA APROXIMADAMENTE 50 VEZES POR ULTRAFILTRAÇÃO E DIAFILTRAÇÃO. O CONCENTRADO FOI PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA SOBRE CAPTO-MMC RESULTANDO NUM FATOR DE PURIFICAÇÃO DE 30-50 VEZES E UM RENDIMENTO DE PELO MENOS 60%. A PREPARAÇÃO PELO MENOS 20% PURA OBTIDA APÓS CROMATOGRAFIA SOBRE CAPTO-MMC JÁ TINHA UM GRAU DE PURIFICAÇÃO QUE PERMITIA A MATURAÇÃO NA COLUNA DA PRO-VWF. EM SEGUIDA, FOI REALIZADA UMA PURIFICAÇÃO ADICIONAL POR CROMATOGRAFIA SOBRE SEPHAROSE ARGININA. ESTE PROCESSO DE DUAS COLUNAS PARA A PURIFICAÇÃO DE FURINA HUMANA TRUNCADA RESULTOU NUMA PREPARAÇÃO DE FURINA QUASE PURA COM UMA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE APROXIMADAMENTE 290 000 U FURINA/MG DE PROTEÍNA E UM RENDIMENTO DE CERCA DE 50%.

RESUMO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PREPARATIVO PARA A FURINA HUMANA"

Furina humana truncada recombinante foi expressada em células CHO e concentrada aproximadamente 50 vezes por ultrafiltração e diafiltração. O concentrado foi purificado por cromatografia em coluna sobre Capto-MMCTM resultando num fator de purificação de 30-50 vezes e um rendimento de pelo menos 60%. A preparação pelo menos 20% pura obtida após cromatografia sobre Capto-MMCTM já tinha um grau de purificação que permitia a maturação na coluna da pro-VWF. Em seguida, foi realizada uma purificação adicional por cromatografia sobre Sepharose Arginina. Este processo de duas colunas para a purificação de furina humana truncada resultou numa preparação de furina quase pura com uma atividade específica de aproximadamente 290 000 U furina/mg de proteína e um rendimento de cerca de 50%.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PREPARATIVO PARA A FURINA HUMANA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de purificação de uma furina humana recombinante ou uma furina humana truncada, a qual é utilizada para o processamento de proteínas precursoras inativas em proteínas maduras.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A família de convertases de proproteína tipo subtilisina de mamífero proteolíticas (SPC ou PC) é homóloga das subtilisinas bacterianas e Kex2p de levedura. Até à data foram identificados sete membros diferentes da família de SPC, incluindo a furina, PC1 (também conhecida como PC3), PC2, PACE4, PC4, PC5 (também conhecida como PC6), PC7 (LPC, PC8 ou SPC7), cada um dos quais exibe uma distribuição única no tecido.

Todas as SPCs são enzimas de domínio múltiplo, constituídas por um propéptido amino-terminal, um domínio catalítico tipo subtilisina, um domínio central e uma extremidade carboxi-terminal única constituída por um ou mais domínios. Os domínios pro-, catalítico e central são essenciais e suficientes para a atividade catalítica. Julga-se que os domínios carboxi-terminais contêm a informação para o direcionamento correto e concentração no compartimento da via secretora no qual as enzimas funcionam.

Estas proteínas têm sido implicadas no processamento de maturação endoproteolítico de proteínas precursoras

inativas incluindo hormonas, fatores de crescimento, recetores, proteínas virais e bacterianas, e proteínas do plasma tais como a albumina, Fator de von Willebrand (VWF), fator VII, fator IX e fator X em sítios consenso básicos simples, emparelhados e múltiplos (Nakayama, Biochem J., 1997;327:625-35).

O membro das SPC furina, também designado PACE (enzima de dissociação de aminoácido básico emparelhado) é ubiquamente expressado em todos os tecidos e linhas de células de mamífero e é capaz de processar uma vasta gama de proteínas precursoras bioativas na via secretora, incluindo também hormonas, fatores de crescimento, recetores, proteínas virais e bacterianas e proteínas do plasma. É uma serina-endoprotease dependente de cálcio estruturalmente organizada em vários domínios, nomeadamente um péptido sinal, propéptido, domínio catalítico, domínio central, (também designado domínio homo-B ou P), o domínio rico em cisteína localizado na extremidade C-terminal, domínio transmembranar e a cauda citoplasmática. O sítio de dissociação de furina-protease compreende uma sequência de reconhecimento que é caracterizada pela sequência de aminoácidos Arg-X-Lys/Arg-Arg (Hosaka et al., J Biol Chem. 1991;266:12127-30).

A furina intacta é incorporada no sistema da membrana do aparelho de Golgi e é ali funcionalmente ativa (Bresnahan et al., J Cell Biol. 1990;111:2851-9). Após trânsito do precursor de furina sintetizado de novo a partir do retículo endoplasmático para o compartimento de Golgi, o propéptido é autocataliticamente removido num evento de processamento em dois passos (Anderson et al., EMBO J. 1997;16:1508-18).

A furina também circula entre a rede trans-Golgi e a superfície da célula através das vesículas endossomais, processando desse modo tanto as proteínas precursoras durante os seu transporte através da via secretora constitutiva bem como as moléculas que entram na via endocítica. A distribuição celular da furina nos compartimentos de processamento é coordenada por características estruturais definidas dentro da sua cauda citoplasmática (Teuchert et al., J Biol Chem. 1999;274:8199-07).

Uma vez que uma sobreexpressão da protease afeta negativamente o crescimento de culturas de células em crescimento contínuo, têm sido procuradas soluções para reduzir a influência tóxica da furina nas células. Determinou-se que os domínios C-terminais são dispensáveis para a atividade funcional da furina e uma forma truncada da furina nativa sobreexpressada de 75-80 kD pôde ser detetada no sobrenadante de células como uma proteína segregada (Wise et al., PNAS. 1990;87:9378-82). Esta furina truncada naturalmente segregada também é conhecida como "furina despojada" (Vidricaire et al., Biochem Biophys Res Comm. 1993;195:1011-8; Plaimauer et al., Biochem J. 2001;354:689-95) e está dissociada na extremidade N-terminal da porção transmembranar (Vey et al., J Cell Biol. 1994;127:1829-42).

Proteínas de furina truncadas por engenharia genética, nas quais a parte de codificação dos domínios transmembranar e citoplasmático foi suprimida foram descritas, por exemplo, para os aminoácidos $\Delta 714-794$ (Leduc et al., J Biol Chem. 1992;267:14304-8; Molloy et al., J Biol Chem. 1992;267:16396-402) e para os aminoácidos $\Delta 716-794$ ("Sol-PACE", Wasley et al., J Biol Chem. 1993;268:8458-65;

Rehemtulla e Kaufman, Blood. 1992; 79:2349-55) e para os aminoácidos $\Delta 705-794$ (Hatsuzawa et al., J Biol Chem. 1992;267:16094-9). Foram também descritos mutantes de furina que compreendem adicionalmente uma supressão da região rica em cisteína (Hatsuzawa et al., J Biochem. 1992;101:296-301; Creemers et al., J Biol Chem. 1993;268:21826-34).

Podem ser concebidas aplicações de SPCs para utilização biotecnológica *in vitro* bem como *in vivo*, incluindo uma aplicação no quadro de um tratamento terapêutico. Para essas aplicações, a furina humana ou furina truncada pode ser mais adequada do que as endopeptidases de origem não humana.

A furina ou furina truncada pode ser aplicável na produção comercial de todos os tipos de substâncias biologicamente ativas (por exemplo, outras enzimas) se o processamento for um passo de produção ali incluído. Por exemplo, a Universidade de Leuven detém patentes para a aplicação de furina na produção industrial de produtos biomédicos relevantes (Patentes US n.º 5,989,856, 5,935,815 e 6,274,365).

Outro exemplo é o processamento de pro-VWF. Na realidade a atividade endoproteolítica da furina e a sua seletividade para aminoácidos básicos foi determinada pela primeira vez em experiências com pro-VWF. A pro-VWF consiste de um propeptídeo com 741 aminoácidos e a VWF madura com 2050 aminoácidos (Verweij et al., EMBO J. 1986;5:1839-47) e é processada na sua forma madura por furina que ocorre endogenamente (Wise et al., PNAS 1990;87:9378-82; Van de Ven et al., Mol Biol Rep. 1990;14:265-75; Rehemtulla e Kaufman, Blood. 1992;79:2349-55). Uma vez que no processo a

jusante o VWF recombinante (rVWF) consiste de até 50-70% de pro-rVWF, a pro-rVWF não completamente maturada tem de ser depois adicionalmente processada *in vitro*. A maturação de pro-rVWF pode ser conseguida por adição de sobrenadante de células CHO contendo furina não purificada ao sobrenadante de pro-rVWF não purificada. No entanto, devido às concentrações baixas de pro-rVWF e furina, este processo de maturação pode durar até vários dias e não é muito reprodutível. Assim, uma furina ou derivado de furina purificado seria preferível para o processo de maturação.

Apesar da potencial utilização generalizada da furina ou furina truncada na maturação de proteínas, surpreendentemente existem apenas algumas divulgações de métodos para a purificação de furina.

A furina de rato truncada recombinante foi purificada apenas por um fator de 7 com um rendimento de 27 % por purificação com uma membrana de troca aniônica seguida de colunas Mono Q e Superose 12 (Cameron et al., J Biol Chem. 2000;275:36741-9).

Hatsuzawa et al. (J Biol Chem. 1992;267:16094-9) conseguiu uma purificação de 100 vezes da furina de rato truncada em células CHO com um rendimento relativamente pequeno de cerca de 10 % utilizando fracionamento com sulfato de amônio, fracionamento em lotes com Toyopearl AF-Blue e cromatografia sobre Toyopearl-DEAE. O mesmo método foi também utilizado por Nakayama et al. como publicado em Methods Enzymol. 1994;244:167-75.

A purificação de furina humana truncada a partir do sobrenadante de células de inseto sujeito a diálise é descrita por Bravo e tal. (J Biol Chem. 1994; 269: 25830-25837).

No entanto, todos estes métodos, devido à utilização de vários passos consecutivos são relativamente demorados, têm um grau de purificação baixo ou um rendimento baixo de furina. Esses métodos de purificação de furina não são úteis para um processo industrial de grande escala onde a furina é apenas necessária por cima da proteína a ser preparada. Assim, existe uma grande necessidade na técnica para um processo de purificação de furina rápido em combinação com um grau de purificação alto e um rendimento elevado. Foi uma tarefa inventiva da presente invenção desenvolver um passo de purificação numa única coluna simples para a furina recombinante ou furina truncada humana com um rendimento alto e grau de purificação suficiente para permitir a maturação de pro-proteínas tais como, por exemplo, o pro-rVWF. Além disso deve ser desenvolvido um passo de purificação adicional subsequente para obter uma furina ou furina truncada essencialmente pura.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A furina, também designada PACE (enzima de dissociação de aminoácido básico emparelhado) a qual é um membro das convertases de proproteína tipo subtilisina é ubiquamente expressada em todos os tecidos e linhas de células de mamífero e é capaz de processar uma vasta gama de proteínas precursoras bioativas na via secretora. A furina ou furina truncada pode ser aplicável na produção comercial de todos os tipos de substâncias biologicamente ativas, se o processamento de pro-proteínas for um passo de produção ali incluído. Apesar da potencial utilização generalizada da furina ou furina truncada na maturação de proteínas estão apenas disponíveis alguns métodos de purificação para a furina, os quais não são ótimos. Para desenvolver um método

de purificação melhorado de furina, furina humana truncada recombinante foi expressada em células CHO e concentrada aproximadamente 50 vezes por ultrafiltração e diafiltração. O concentrado pôde ser purificado por cromatografia em coluna sobre Capto-MMC™ resultando num fator de purificação de 30-50 vezes e um rendimento de pelo menos 60%. A preparação de furina truncada pelo menos 20% pura obtida após cromatografia sobre Capto-MMC™ já tinha um grau de purificação que permitia a maturação na coluna de pro-Fator de von Willebrand. Foi também realizada uma purificação adicional por cromatografia sobre Sepharose Arginina. O processo de duas colunas para purificação de furina humana truncada resultou numa preparação quase pura com uma atividade específica de aproximadamente 290 000 U furina/mg de proteína e um rendimento de cerca de 50%.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O termo "furina" é bem definido na técnica, podendo ser encontrados exemplos na base de dados Swiss-Prot/TrEMBL (N.º de Acesso P09958) e numa forma de realização da invenção a furina significa o péptido divulgado in e codificado pelas sequências de ADN divulgado na Patente US n.º 5,986,079.

O termo "derivado de furina" inclui fragmentos truncados do aminoácido furina (também designado "furina despojada"), variantes naturais ou sequências deliberadamente modificadas das mesmas. Assim, também todas as proteínas que foram geradas a partir da furina ou do análogo de furina truncada por inserção, supressão ou troca de aminoácidos e os quais têm uma atividade biológica tipo furina podem ser purificadas pelos métodos aqui divulgados.

A furina e o derivado de furina pode ser produzido por tecnologia recombinante, isto é, expressando ADN que codifica essa furina ou derivado de furina numa célula hospedeira apropriada transformada com esse ADN.

Uma furina truncada pode ser gerada por truncamento do ADN que codifica a furina na sua extremidade 3'-terminal e/ou na sua extremidade 5'-terminal, enquanto retém as sequências que codificam a atividade endopeptidase da furina. Pode ser desejável suprimir a sequência de codificação quanto à região transmembranar (TM) e/ou à região rica em cisteína (CRR). Pode ser também desejável remover a região que codifica a sequência sinal e/ou substituí-la por uma sequência heteróloga. Uma furina truncada a ser purificada num método de acordo com a presente invenção também pode conter um domínio transmembranar putativo que pode servir para ancorá-la nas membranas do aparelho de Golgi.

Pode ser também desejável ligar uma porção da sequência de ADN de furina (particularmente uma porção que inclui a região de codificação do domínio catalítico) a uma sequência de codificação heteróloga e criar, desse modo, um péptido de fusão com a especificidade enzimática da furina.

Numa forma de realização preferida da presente invenção uma furina truncada é de origem humana e está truncada na extremidade C-terminal carecendo dos aminoácidos 578 a 794 da sequência de aminoácidos da furina humana de tipo selvagem como divulgada, por exemplo, na Patente US n.º 5,986,079. Uma furina truncada a ser purificada num método de acordo com a presente invenção é truncada de uma forma que pode ser expressada em quantidades altas numa célula

sem ser substancialmente tóxica para a célula. Tais furinas truncadas são conhecidas na técnica.

Uma furina ou furina truncada purificada com os métodos divulgados na presente invenção pode ser utilizada para preparar proteínas a partir de pro-proteínas por dissociação proteolítica. As pro-proteínas pretendem incluir todos os precursores de proteínas que podem ser convertidos em proteínas funcionais por tratamento proteolítico adequado. Em particular, as pro-proteínas podem ser proenzimas, pre-proenzimas ou outros precursores (inativos) de proteínas ou enzimas utilizáveis bioquímica, fisiológica ou biotecnologicamente.

Os exemplos de polipéptidos precursores incluem, mas não se limitam a fatores de coagulação, tais como VWF, fator IX, proteína C, proteína S, protrombina, fator X, fator VII e proteína gama-carboxiglutamato do osso, insulina, fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de tecido nervoso (NGF).

A produção de uma furina ou furina truncada de acordo com o presente pedido pode incluir qualquer método conhecido na técnica para a manipulação genética de ADN recombinante que codifica essa proteína, por exemplo via transcrição inversa de ARN e/ou amplificação de ADN seguida de uma variedade de métodos para transfeção dos vetores e expressão recombinante da proteína. Podem ser utilizados todos os sistemas de expressão eucarióticos habituais, tais como uma variedade de vetores, linhas de células permanentes ou sistemas de expressão virais. O ADN recombinante que codifica uma furina, furina truncada ou derivado de furina, por exemplo um plasmídeo, também pode conter uma sequência

de ADN que codifica um marcador selecionável para selecionar as células que foram transfetadas com sucesso com o plasmídeo.

As linhas de células para a produção recombinante de uma furina ou furina truncada a ser purificada num método de acordo com a invenção podem ser produzidas por integração estável do ADN exógeno no cromossoma da célula hospedeira. O tipo de célula hospedeira pode ser qualquer célula eucariótica. A célula pode ser uma célula de mamífero com a aptidão para realizar modificações pós-tradução de uma furina, furina truncada ou derivado de furina. Por exemplo, a referida célula de mamífero é derivada de uma linha de células de mamíferos como, por exemplo, um linha de células selecionada do grupo consistindo de células SkHep, CHO, HEK293 e BHK. Como os sistemas de expressão eucarióticos, também podem ser utilizadas leveduras e outros tipos de células que expressam furina endógena, furina truncada ou derivados de furina. Podem ser também utilizados animais transgênicos para a expressão de uma furina ou dos seus derivados. Para a expressão de proteínas recombinantes, as células CHO-DUXS B11 mostraram ser particularmente adequadas (Urlaub et al., PNAS 1980;77:4216-20). As células podem ser cultivadas em qualquer escala. Num exemplo específico, as células CHO foram cultivadas por fermentação quimiostática à escala de 80-200 L.

Não há qualquer limitação particular ao meio, reagentes e condições utilizados para cultivar as células. As células podem ser cultivadas de uma forma contínua ou por lotes com soro, mas também sob condições isentas de soro ou isentas de soro e proteína.

Uma furina a ser purificada num método de acordo com a presente invenção pode ser isolada a partir de células por lise e ainda purificada por métodos convencionais, opcionalmente na presença de inibidores de protease. A furina é ativa num meio relativamente ácido com um pH de 5,5, como ocorre nos grânulos secretores, mas a proteína mantém também a sua atividade a pH 7,5. A atividade de furina depende da presença de iões Ca^{2+} . Para a atividade enzimática *in vitro*, determinou-se que uma concentração de cálcio de 2-5 mM é ótima. A presença de quelantes de metais tais como EDTA inibem fortemente a atividade de furina.

A avaliação da atividade proteolítica de uma furina, furina truncada ou derivado de furina pode ser realizada por qualquer ensaio adequado, por exemplo utilizando substratos fluorogénicos que são constituídos por um sítio de dissociação dibásico para o qual a furina é específica (Schlokot et al., *Biotechnol Appl Biochem.* 1996;24:257-67). No referido ensaio, 1 Unidade é definida como a quantidade de furina que libertará 1 pmol de 7-Amino-4-metilcumarina (AMC) a partir do substrato fluorogénico Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC em 1 minuto a 30°C. Alternativamente a atividade proteolítica também pode ser medida incubando a furina com pro-proteínas, por exemplo pro-rvWF, durante um período de tempo suficiente. O grau de processamento de pro-rvWF pode ser analisado, por exemplo, por transferência de Western.

A presente invenção proporciona um método para purificar furina produzida de forma recombinante a partir do meio de cultura de células. Uma furina, furina truncada ou derivado de furina pode ser surpreendente e vantajosamente purificado por meio de uma resina de troca aniónica com um potencial para ligar a furina a pH 6,0 tal como os geles de cromatografia estáveis à pressão Fractogel TMAE® EMD 650M

(Merck, Darmstadt, Alemanha) e Capto Q™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha).

Verificou-se que o Capto Q™ é surpreendentemente eficiente para ser utilizado na captura e purificação intermédia de alimentações de expressão elevada e alto volume de furina, furina truncada ou derivado de furina. A matriz extremamente rígida permite uma gama de trabalho mais lata de caudais, alturas de leito e viscosidades de amostra, os quais influenciam todos positivamente os custos de processamento. Os caudais elevados aumentam o débito de volume e reduzem o tempo de processo; as alturas de leito maiores eliminam a necessidade de equipamento grande e mantêm a área ocupada pequena; e o processamento de caudal elevado de amostras viscosas significa menos diluição e tempos de ciclo mais curtos.

Noutra forma de realização do presente pedido foi utilizada a resina Capto-MMC™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha). Ao utilizar a referida resina puderam ser obtidos fatores de purificação surpreendentemente altos de 30 -50, rendimentos altos de pelo menos 60 % e uma atividade específica de pelo menos 100 000 U/mg de proteína com um único passo de purificação.

Ainda noutra forma de realização da presente invenção, a furina truncada purificada sobre uma resina Capto-MMC™ foi ainda purificada sobre uma resina de Sepharose Arginina tal como a coluna de Sepharose-Arginina 4B™ (GE Healthcare). Ao utilizar as referidas duas resinas puderam ser surpreendentemente obtidos um fator de purificação alto de 140, rendimentos altos de 50%, um fator de purificação de aproximadamente 140, uma pureza de pelo menos 90-95%, e uma atividade específica de 290 000 U/mg de proteína.

Uma diversidade de sistemas tampão pode ser utilizada para tamponar a furina, furina truncada ou derivados de furina e equilibrar as colunas utilizadas na presente invenção. Em geral, pode ser utilizado qualquer tampão possuindo capacidade tamponante a pH 6,0. Isto inclui, por exemplo, os tampões de fosfato, citrato e Tris. Numa forma de realização da presente invenção o tampão é Hepes 50 mM/CaCl₂ 1 mM e noutra forma de realização acetato de sódio 10 mM/CaCl₂ 1 mM. O pH situa-se na gama desde 5,5 a 8,0 e noutra forma de realização o pH é 6,0.

É também divulgada uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade endoproteoliticamente ativa de uma furina ou uma furina truncada purificada de acordo com a presente invenção, e um veículo farmaceuticamente aceitável. O veículo pode ser preferencialmente uma formulação líquida e é preferencialmente uma solução aquosa isotónica, tamponada. Uma furina ou furina truncada purificada de acordo com a presente invenção pode ser proporcionada como uma preparação farmacêutica possuindo um polipéptido de furina como uma preparação de um único componente ou em associação com outros componentes como um sistema de componentes múltiplos como, por exemplo, as pro-proteínas de VWF.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem também excipientes, tais como diluentes e semelhantes, e aditivos, tais como estabilizantes, conservantes, solubilizantes e semelhantes. Os polipéptidos purificados por um método desta invenção podem também estar na forma de qualquer sal farmaceuticamente aceitável.

Como aqui utilizado, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo

dos EUA ou UE ou listado na Farmacopeia dos EUA ou noutra farmacopeia geralmente reconhecida para ser utilizada em animais e, mais particularmente, em humanos.

Os seguintes exemplos ilustram a presente invenção mas não limitam de alguma maneira o âmbito da invenção.

FIGURAS

Figura 1 mostra a purificação de uma furina truncada por cromatografia em coluna sobre Capto MMC™ utilizando eluição em degrau (Exemplo 5)

Figura 2 mostra a purificação de uma furina truncada por cromatografia em coluna sobre Capto MMC™ utilizando eluição gradiente (Exemplo 5)

Figura 3 mostra a purificação de uma furina truncada obtida a partir da cromatografia em coluna sobre Capto MMC™ com uma cromatografia sobre Sepharose Arginina adicional (Exemplo 6)

Figura 4 mostra a separação SDS-PAGE de uma furina truncada purificada por Capto MMC™ e Capto-MMC™ em associação com colunas de Sepharose Arginina (Exemplo 2 e Exemplo 6)

EXEMPLOS

Exemplo 1 Expressão e Análise de Furina Truncada Recombinante

Furina humana truncada que carece dos aminoácidos 578 a 794 (SEQ ID NO:1) foi expressada em células CHO que foram cultivadas por fermentação quimiostática à escala de 80-

200 L. Um sobrenadante de células CHO contendo furina foi concentrado aproximadamente 50 vezes (unidade de ultrafiltração com uma membrana Hydrosart 30 kDa de 0,6 m², Sartorius Göttingen, Alemanha) e diafiltrado contra Hepes 50 mM, CaCl₂ 1mM, pH 6,0 e conservado a -20°C e até à sua utilização (dentro de uma semana).

O teor de proteína das amostras foi medido de acordo com o princípio descrito por Bradford (Anal Biochem. 1976;72:248-54) utilizando o Concentrado de Reagente Corante de Ensaio de Proteína de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). O procedimento de microensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e calibrado utilizando uma preparação de soro humano certificada (Qualitrol HS-N, DiaSys Diagnostics, Holzheim, Alemanha), obtendo uma gama de calibração de 20 a 1,8 µg de proteína/mL. As amostras concentradas foram diluídas em NaCl a 0,9%.

A atividade enzimática de furina foi determinada num ensaio fluorogénico. Neste ensaio, 1 Unidade é definida como a quantidade de furina que libertará 1 pmol de 7-Amino-4-metilcumarina (AMC) a partir do substrato fluorogénico Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC em 1 minuto a 30°C. O padrão de furina recombinante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) foi diluído 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320 em Hepes 100 mM, 0,5 % de Triton X-100, CaCl₂ 1 mM, 2-Mercaptoetanol 1 mM, pH 7,5). Foram agitados 150 µL das amostras diluídas com 50 µL de substrato (sal de acetato de Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC; Bachem Distribution Service GmbH; Weil am Rhein, Alemanha) durante 120 minutos a 30°C numa placa microtítulo preta para aplicações de fluorescência. A libertação de AMC foi medida num espectrofotómetro de fluorescência a 360 nm/460 nm em menos de 10 minutos após incubação. As

concentrações de furina foram calculadas utilizando uma curva de referência com furina.

As proteínas de CHO contaminantes foram determinadas num formato de ensaio ELISA em sanduíche de dois sítios utilizando um excesso de anticorpo de detecção e a técnica imune multicamada de incubação única SIMIT (Naser, Immunol Methods. 1990;129:151-7). O antigénio da célula hospedeira foi preparado a partir do sobrenadante da cultura de células da linha de células CHO progenitoras não recombinantes DUKX. Os anticorpos policlonais contra os antigénios da célula hospedeira foram gerados em cabras. Para revestimento foi utilizada uma solução 1:500 de anticorpo de cabra anti-CHO (preparação feita no laboratório) em tampão de revestimento (carbonato de sódio 100 mM, hidrogenocarbonato de sódio 100 mM, ajustado a pH 9,5 com HCl). Foi utilizado PBST (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, di-hidrogenofosfato de potássio 1,5 mM, hidrogenofosfato dissódico desidrato 7 mM, 0,5 mL de Tween 20, 0,1% de albumina de soro bovino e benzamidina 2 mM) para diluição da amostra e bloqueio. Uma combinação de um anticorpo biotinilado no laboratório (biotina anti-CHO de cabra) e estreptavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizada para detecção utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) como substrato. A preparação de células hospedeiras purificadas por afinidade foi utilizada como padrão de ensaio (padrão de doseamento da proteína de CHO, 380 ng/mL, preparação no laboratório) cobrindo uma gama de calibração de ensaio de 95 ng/mL a 3 ng/mL de proteína de CHO. As amostras foram determinadas após transformação logarítmica das ODs e as concentrações de proteína de CHO das diluições padrão e cálculo de uma curva de regressão linear.

O teor de endotoxina de uma preparação de furina truncada foi determinado num ensaio de Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL). O LAL contém um sistema enzimático que é ativado na presença de endotoxina. Resumidamente, as enzimas ativadas eliminam para-nitroanilina (pNA) a partir do substrato cromogénico S-2423 (Ac-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA.HCl, CoaCrom Diagnostica GmbH, Viena, Áustria) para produzir uma cor amarela. A libertação de pNA é medida cineticamente num leitor de ELISA a 405 nm. A concentração de endotoxina é calculada utilizando uma curva de referência com padrão de endotoxina (E. coli 0111:B4).

Exemplo 2 Identificação da Resina Capto-MMC™ como Passo de Purificação de uma Única Coluna

Uma furina truncada expressada e analisada como descrito acima foi purificada para comparação em diferentes resinas de cromatografia não utilizadas anteriormente para preparação de furina ou furina truncada. Foram testadas duas resinas de troca aniónica, isto é, Fractogel TMAE® (trimetilaminoetil)-EMD 650M (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Capto Q™ (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) e um gel misto de troca catiónica / interação hidrófoba (Capto MMC™) (GE Healthcare) em relação à purificação e potencial de concentração de furina truncada derivada do sobrenadante de células CHO. Os ensaios de cromatografia foram realizadas com tampão Hepes 50 mM/CaCl₂ 1 mM a um pH de 7,5 (TMAE® e Capto Q™) e 5,5 -8,0 (Capto MMC™). A carga de coluna da furina truncada e a condutividade foi modificada para os ensaios de cromatografia individuais (Quadro 1). A furina ligada foi eluída utilizando um gradiente linear de NaCl 0-500 mM em tampão de carga em 15 CV. Deve referir-se que todas as amostras de furina truncada preparadas estavam isentas de endotoxinas.

Quadro 1. Comparação da Purificação de Furina Truncada com Diferentes Resinas de Cromatografia

Coluna	Carga (U/mL Gel)	Condutividade (mS/cm)	Recuperação (%)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (Fator)	Remoção da Proteína de CHO (Fator)
TMAE	2 705	6,7	36	n.d.	n.d.	1,3
TMAE	4 016	5,2	57	2 248	2,4	1,7
TMAE	4 403	4,8	46	2 533	3,0	1,7
TMAE	10 635	5,2	37	2 049	2,5	2,4
TMAE	32 625	5,0	68	10 011	5,3	2,4
Capto Q	16 847	4,5	45	8 797	7,4	5,5
Capto Q	33 781	4,8	51	14 138	8,9	5,0
Capto Q	21 860	4,5	71	7 789	7,1	4,5
Capto MMC	5 358	4,3	56	38 611	30,3	96
Capto MMC	13 218	3,9	63	110 424	37,6	56
Capto MMC	6 972	7,8	76	27 693	27,1	45

Uma vez que os resultados para as diferentes colunas foram relativamente homogêneos dentro de cada grupo, foram calculadas as médias para uma melhor visão geral. As médias das 5 experiências com TMAE®, 3 com Capto Q™ e 3 com Capto MMC™, respectivamente, são mostradas no Quadro 2.

Quadro 2. Visão Geral da Comparação da Purificação de Furina Truncada com Diferentes Resinas de Cromatografia

Coluna	Recuperação (%)	Atividade Esp. (U/mg)	Purificação (Fator)	Remoção da Proteína de CHO (Fator)
TMAE	49	4 210	3,3	1,9
Capto Q	56	10 241	7,8	5,0

Coluna	Recuperação (%)	Atividade Esp. (U/mg)	Purificação (Fator)	Remoção da Proteína de CHO (Fator)
Capto MMC	65	58 909	32	66

Enquanto as TMAE® e Capto Q™ podiam aumentar a pureza da furina truncada por um fator de 3 e 8, respetivamente, a Capto MMC™ resultou num fator de purificação de 32. O rendimento de furina truncada no eluato da coluna foi de 65% para a Capto MMC™, 56% para a Capto™ Q e 49% para a TMAE®.

Além do fator de purificação elevado da furina truncada, a utilização de Capto MMC™ também resultou no fator de remoção mais elevado da contaminação por proteínas de CHO. Como medida pelas bandas reveladas com Coomassie num gradiente de 8 - 18% de SDS-gel, a furina truncada era pelo menos 20% pura. Os exemplos típicos são mostrados na Figura 4: 3 µg de preparações diferentes de furina truncada de eluatos de Capto-MMC™ foram carregadas nas pistas 4-7 (Pista 1: padrão de furina, pistas 2 e 3: eluatos de Sepharose Arginina, M = marcador de peso molecular).

Exemplo 3 Substituição de Tampão de Hepes por Tampão de Acetato de Sódio

Para reduzir os custos de tampão (aproximadamente 500 € por coluna de 1 L) foram testados sistemas tampão alternativos. Não foi possível uma redução na concentração de Hepes, porque isso resultava numa perda substancial de furina truncada no caudal de carga e fração de lavagem. As colunas Capto MMC™ foram carregadas com 5 000 - 30 000 U de furina/mL de gel e eluídas utilizando um gradiente de NaCl 0-500 mM em tampão de carga em 15 CV.

Foram testados vários sistemas tampão e verificou-se que o acetato de sódio 10 mM conseguia pelo menos um fator de purificação, rendimento e capacidade semelhantes em comparação com o tampão de Hepes 50 mM. A média de três experiências utilizando tampão de Hepes ou acetato de sódio é mostrada no Quadro 3.

Quadro 3. Comparação de Tampão de Hepes e Acetato de Sódio

Tampão	Recuperação (%)	Atividade Esp. (U/mg)	Purificação (Fator)	Remoção da Proteína de CHO (Fator)
Hepes	65	58 909	32	66
Acetato de sódio	95	50 951	24	30

Exemplo 4 Otimização da Purificação de Furina Truncada em Colunas Capto MMC™ por Modificação da Condutividade

As colunas Capto MMC foram carregadas com 70 000 - 100 000 U de furina/mg de gel. A solução de carga foi submetida a diálise contra acetato de sódio 10 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 6,0 resultando numa condutividade de aproximadamente 1mS/cm. As perdas de furina truncada no caudal de carga e frações de lavagem da coluna de Capto MMC podiam ser substancialmente reduzidas em aproximadamente 17% até um nível não detetável ajustando a condutividade a 1 mS/cm. Além do mais, a carga da coluna podia ser aumentada até aproximadamente 100 000 U de furina/mL de gel (Quadro 4). Foi observada uma perda substancial de furina truncada após aplicação de 150 000 U de furina/mL de gel. No entanto, pode esperar-se que a carga da coluna possa ser aumentada para 150 000 U/mL de gel durante a otimização para a preparação em grande escala.

Quadro 4. Purificação de Furina Truncada em Colunas de Capto MMC™ a uma Condutividade de 1 mS/cm

Carga de Furina (U/mL de Gel)	Recuperação (%)	Atividade Esp. (U/mg)	Purificação (Fator)	Remoção da Proteína de CHO (Fator)
105 700	19	57 692	23,7	18,8
70 400	97	96 896	37,7	29,4
74 700	94	138 299	55,3	41,8
91 500	90	140 866	53,8	n.d.
Média	61	87 474	34,4	22,9

Exemplo 5 Recuperação de Furina Truncada a partir de Colunas de Capto MMC™ por Eluição Gradiente ou em Degrau

Para aumentar a robustez da cromatografia em coluna, o gradiente de cloreto de sódio para eluição da furina truncada foi substituído por gradientes em degrau. Aproximadamente 80 000 U/mL de gel (gradiente) e 30 000 U/mL de gel (gradiente em degrau) de furina truncada (submetida a diálise contra acetato de sódio 10 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 6,0) foram carregadas numa coluna de Capto MMC™. Os ensaios de cromatografia foram realizados com tampão de acetato de sódio 10 mM/ CaCl₂ 1 mM a pH 6. Além da eluição gradiente de NaCl 0-500 mM em tampão de carga de acetato de sódio em 15 volumes de coluna, foi realizado um passo de lavagem adicional com tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio 30 mM e eluição com cloreto de sódio 230 mM no mesmo tampão. A coluna foi lavada com 30 volumes de tampão de equilíbrio e em seguida com 10 volumes de tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio 30 mM. A furina truncada foi eluída com 14 volumes de tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio 230 mM. Foram recolhidos os primeiros 3 volumes do eluato de cloreto de sódio 230 mM. Isto resultou num fator de purificação inferior e numa concentração absoluta de furina truncada inferior no eluato. A média de 2 experiências, respetivamente, é

mostrada no Quadro 5. Em contraste com isto, a recolha do pico da furina truncada eluída (Figura 1) a partir da eluição em degrau foi melhor em comparação com a recolha do pico obtido a partir da eluição gradiente (Figura 2).

Quadro 5. Eluição Gradiente ou Gradiente em Degrau de Furina Truncada a partir de Colunas Capto MMC™

Eluição	Recuperação (%)	Atividade Esp. (U/mg)	Purificação (Fator)
Gradiente	92	139 592	55
Gradiente em degrau	92	31 725	14

Exemplo 6 Purificação Adicional em Coluna de Sepharose-Arginina da Furina Truncada Eluída das Colunas de Capto MMC™

Uma preparação de furina truncada pelo menos 20% pura obtida após cromatografia sobre Capto-MMC™ já tinha um grau de purificação que permitia a maturação na coluna de pro-VWF. Para um fator de purificação mais alto pode ser realizada uma purificação adicional por cromatografia sobre Sepharose-Arginina.

Um eluato contendo furina truncada do passo de Cromatografia sobre Capto-MMC™ foi submetida a diálise contra tampão de Hepes 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,0 e foram carregadas aproximadamente 33 000 U de furina/ mL de gel numa coluna de Sepharose-Arginina 4B™ (GE Healthcare) equilibrada no mesmo tampão. A furina truncada foi eluída com um gradiente de NaCl 0 - 250 mM em tampão de equilíbrio dentro de 25 volumes de coluna. O ensaio de cromatografia é mostrado na Figura 3. Um pico de furina truncada que elui a aproximadamente NaCl 60 mM foi concentrado 5 vezes por

ultrafiltração utilizando uma membrana de polissulfona com corte de 10 kDa e ajustado a NaCl 150 mM. Após filtração estéril sobre Sartobran P (Sartorius, Göttingen, Alemanha), a furina truncada foi conservada a -20°C . A atividade específica da furina truncada foi aproximadamente 290 000 $\pm$ 60 000 U/mg de proteína ($n=3$). O rendimento global em comparação com o sobrenadante de fermentação como material de partida foi aproximadamente 50% ($n=3$), o fator de purificação total aproximadamente 140 e a pureza pelo menos 90-95% como determinado por revelação com Coomassie antes da ultraconcentração (Figura 4, pista 3) e após a ultraconcentração (Figura 4, pista 2).

De acordo com os exemplos mostrados na presente invenção, o melhor método para a purificação de furina truncada consiste em ajustar aproximadamente 150 milhões de unidades de um concentrado de furina truncada (80 000 – 100 000 U/mL de gel) a pH 6,0 $\pm$ 0,1 e aplicá-lo a uma coluna Captop-MMC™ BPG100/20 de 1,5 L equilibrada contra acetato de sódio 10 mM, CaCl_2 1 mM, pH 6,0. A coluna é lavada com 30 volumes de tampão de equilíbrio e, em seguida, com 10 volumes de tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio 30 mM. A furina truncada é eluída com 14 volumes de tampão de equilíbrio contendo cloreto de sódio 230 mM. A colheita dos primeiros 3 volumes do eluato de cloreto de sódio 230 mM resulta na solução de furina mais concentrada. Se forem desejados graus de purificação mais altos pode ser realizada uma purificação adicional por cromatografia sobre Sepharose Arginina.

Listagens de Sequências da Referência de Ficheiro #6382

SEQ ID NO: 1

Furina Truncada

MELRPWLLWV	VAATGTLVLL	AADAQGQKVF	TNTWAVRIPG	GPAVANSVAR	KHGFLNLGQI	60
FGDYHFWHR	GVTKRSLSPH	RPRHSRLQRE	PQVQWLEQOV	AKRRTKRDVY	QEPTDPKFPQ	120
QWYLSGVTQR	DLNVKAAWAQ	GYTGHGIVVS	ILDDGIEKNH	PDLAGNYDPG	ASFDVNDQDP	180
DFQPRYTQMN	DNRHGTRCAG	EVAAVANNGV	CGVGVAYNAR	IGGVRMLDGE	VTDAVEARSL	240
GLNPNHIHIY	SASWGPEDOG	KTVDGPARLA	EEAFFRGVSQ	GRGGLGSIFV	WASGNGGREH	300
DSCNCDGYTN	SIYTLSSISSA	TQFGNVPWYS	EACSSTLATT	YSSGNQNEKQ	IVTTDLRQKC	360
TESHTGTSAS	AFLAAGIIAL	TLEANKNLTW	RDMQHLVVQT	SKPAHLNAND	WATNGVGRKV	420
SHSYGYGLLD	AGAMVALAQN	WTTVAPQRKC	IIDILTEPKD	IGKRLEVVRKT	VTACLGEPNH	480
ITRLEHAQAR	LTLNRRRGD	LAIHLVSPMG	TRSTLLAARP	HDYSADGFND	WAFMTTHSWD	540
EDPSGEWLE	IENTSEANNY	GTLTKFTLVL	YGTAPEG			577

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Baxter International Inc. e tal.

<120> Processo de Purificação Preparativo para Furina Humana

<130> B 2827EU

<150> US 60/931,301

<151> 2007-05-22

<160> 1

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 577

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Furina Truncada

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525

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

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

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

Gly

Lisboa, 11 de abril de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Método de purificação de um polipéptido de furina ou um polipéptido de furina truncada a partir de uma solução proteica compreendendo os seguintes passos:
 - (a) ligar o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a uma resina mista de troca catiónica/interação hidrófoba com um potencial para ligar o polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a pH 6,0, e
 - (b) recuperar o polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a partir da resina por eluição.
2. Método da reivindicação 1, caracterizado por o referido polipéptido de furina truncada ser o polipéptido de furina de acordo com a SEQ ID NO: 1.
3. Método da reivindicação 1, em que a eluição é eluição em degrau.
4. Método da reivindicação 3, em que o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada é ligado à referida resina mista de troca catiónica/interação hidrófoba em acetato de sódio 10 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0, lavado com cloreto de sódio 30 mM, acetato de sódio 10 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0, e eluído com cloreto de sódio 230 mM, acetato de sódio 10 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0.
5. Método da reivindicação 4, em que o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada é ligado à referida resina mista de troca catiónica/interação hidrófoba em Hepes 50 mM, CaCl_2

1 mM pH 6,0, lavado com cloreto de sódio 30 mM, Hepes 50 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0, e eluído com cloreto de sódio 230 mM, Hepes 50 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0.

6. Método da reivindicação 1, em que a eluição é eluição gradiente.
7. Método da reivindicação 6, em que o referido gradiente é NaCl 0-500 mM em acetato de sódio 10 mM, CaCl_2 1 mM pH 6,0.
8. Método de recuperação de um polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada compreendendo os seguintes passos:
 - (a) ligar o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a uma resina mista de troca catiónica/interação hidrófoba,
 - (b) eluir o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a partir da resina mista de troca catiónica/interação hidrófoba,
 - (c) ligar o polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada eluído a uma resina de Sepharose-Arginina, e
 - (d) eluir o referido polipéptido de furina ou polipéptido de furina truncada a partir da resina de Sepharose-Arginina.
9. Método da reivindicação 8, caracterizado por o referido polipéptido de furina truncada ter a sequência mostrada na SEQ ID NO: 1.

Lisboa, 11 de abril de 2013

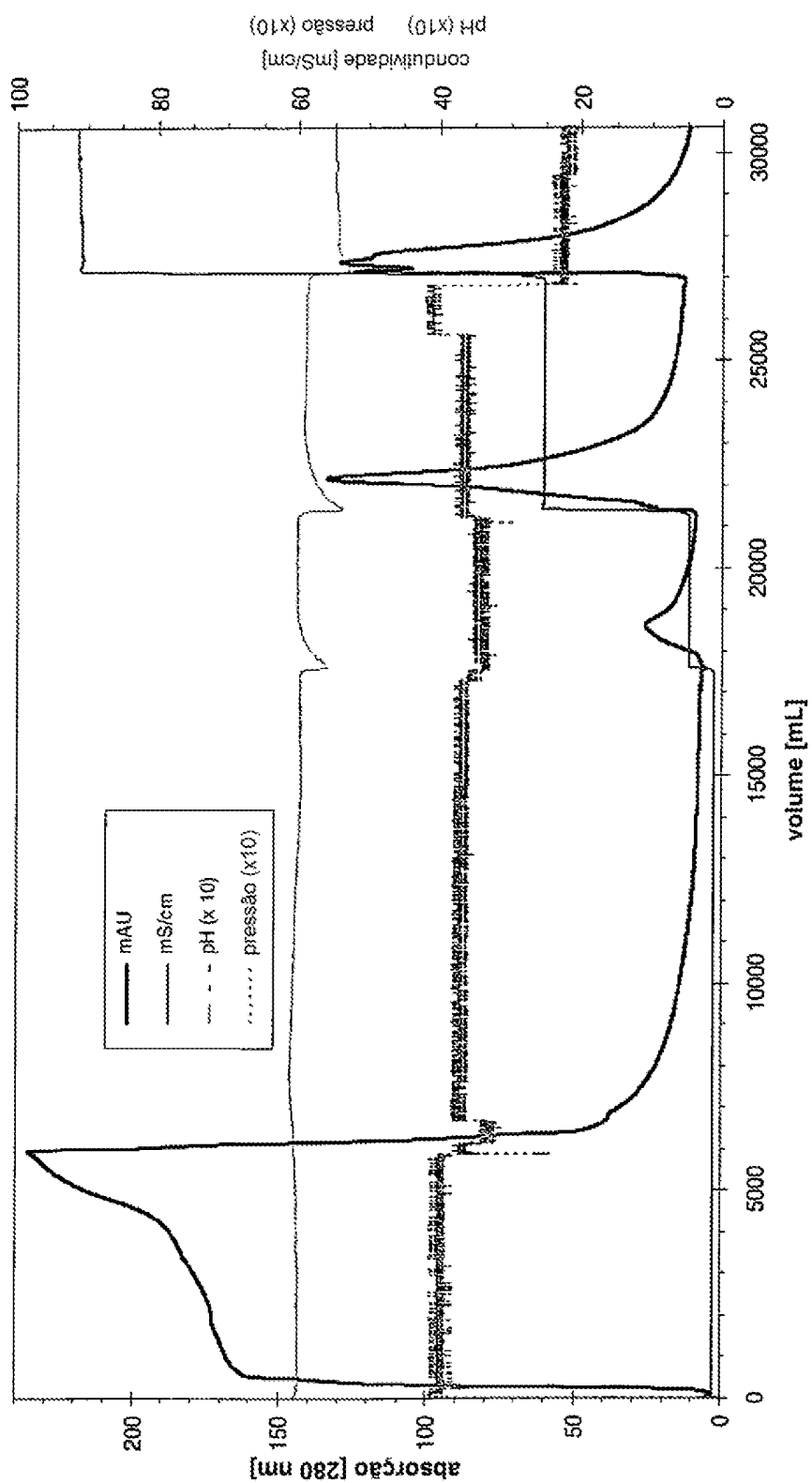


Figura 1

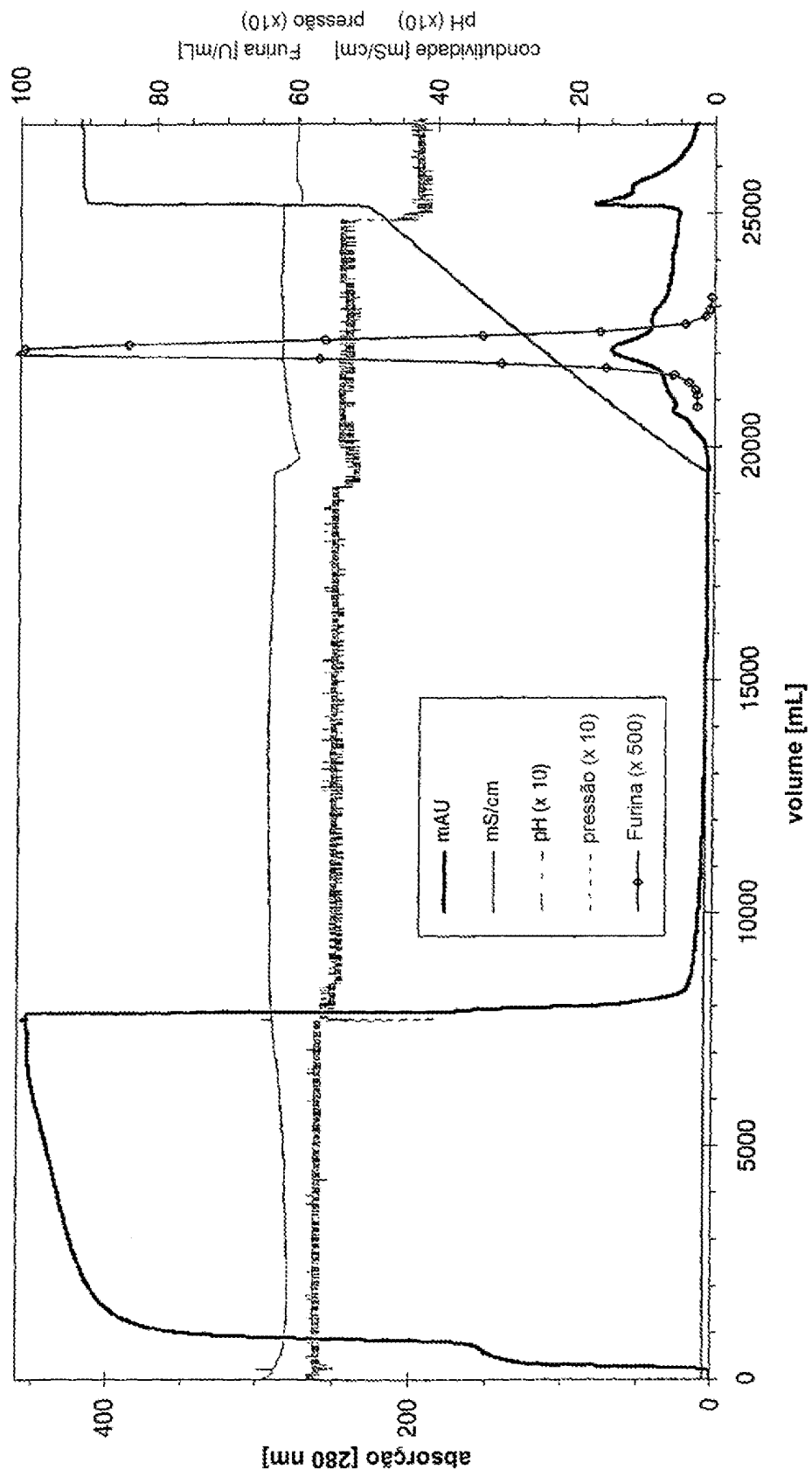


Figura 2

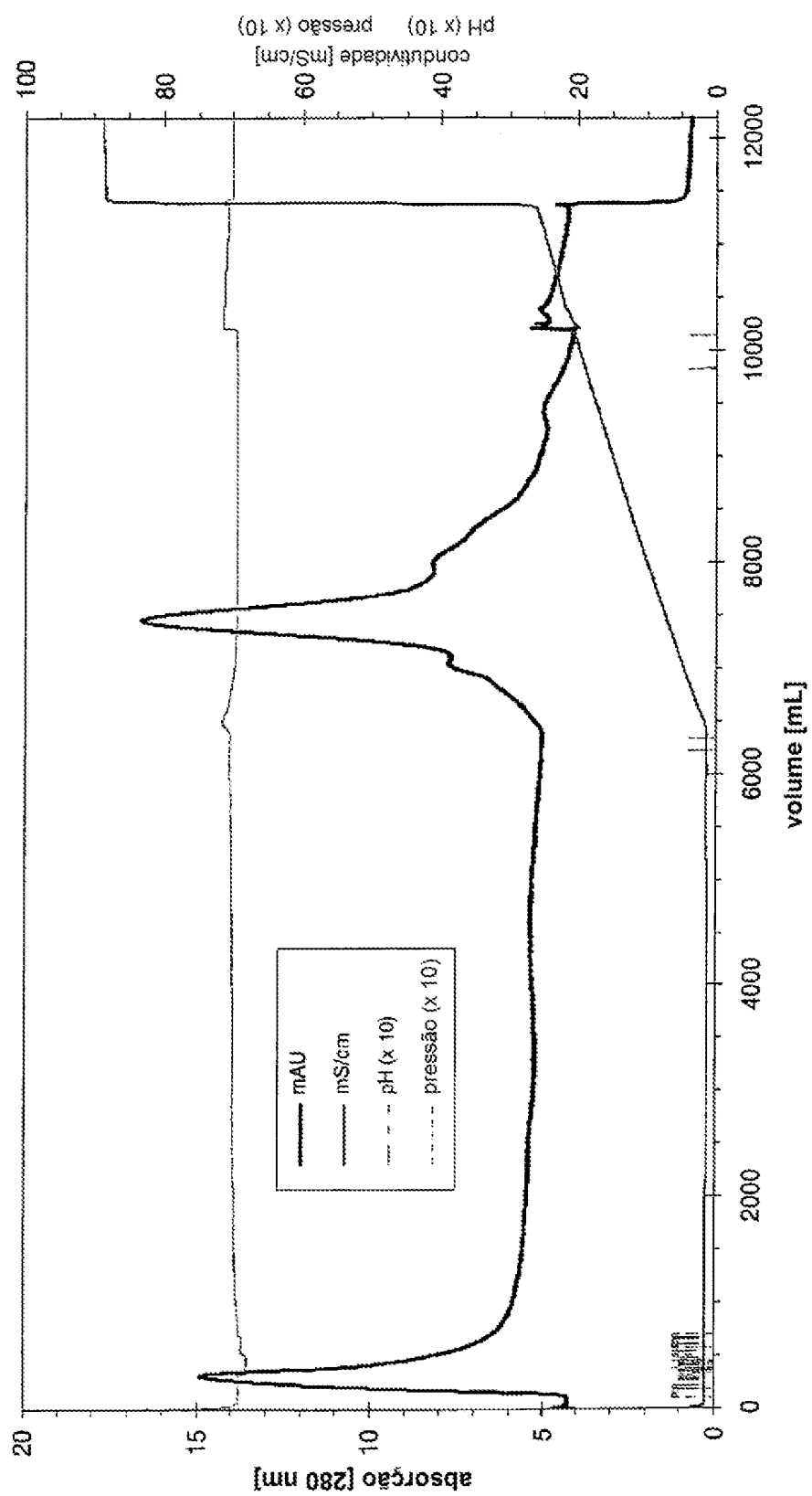


Figura 3

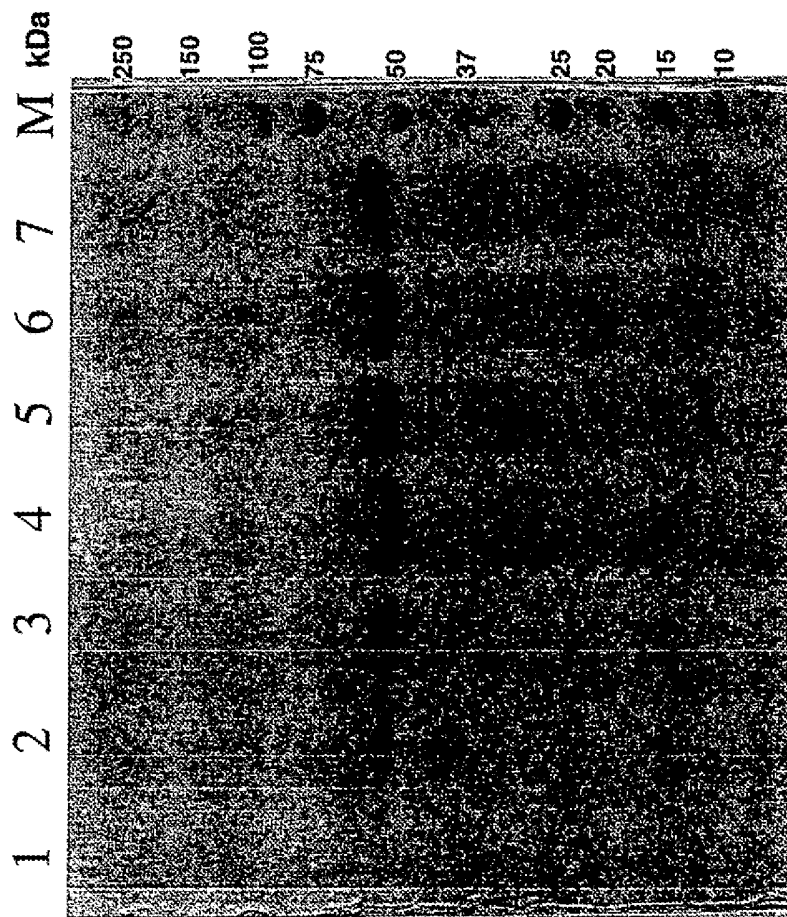


Figura 4