

REIVINDICACIONES:

1. Un método para preparar un producto de polipéptido expresado a partir de una construcción de polinucleótidos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 7, caracterizado porque comprende:

agregar un detergente a una muestra que contiene un producto de polipéptido expresado a partir de la construcción de polinucleótidos, en donde el detergente inactiva los virus con envoltura en la muestra;

cargar la muestra en un cromatógrafo por afinidad basado en el inhibidor de la tripsina de soja (STI) y eluir el polipéptido con un primer amortiguador de elución para generar una primera muestra eluida, en donde la muestra cargada no contiene un solvente orgánico, y en donde el primer amortiguador de elución comprende arginina y disocia el polipéptido del cromatógrafo de afinidad basado en STI;

cargar la primera muestra eluida en un cromatógrafo de modo mixto y de intercambio de iones que comprende hidroxipatita cerámica y eluir el polipéptido con un segundo amortiguador de elución que comprende 0,5M a 3M de una sal inorgánica para generar una segunda muestra eluida; y

cargar la segunda muestra eluida en un cromatógrafo de interacción hidrofóbica y eluir el polipéptido con un tercer amortiguador de elución que comprende cloruro de sodio 2mM a 5M,

preparando de este modo una muestra purificada que comprende el producto de polipéptido.

2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el detergente comprende Tritón X-100 (p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter de polietilenglicol).

3. El método de la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el primer amortiguador de elución comprende arginina 0,5M a 2M.

4. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el primer amortiguador de elución tiene un pH de 5 a 5,4.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el cromatógrafo de modo mixto e intercambio de iones comprende un cromatógrafo de hidroxapatita cerámica tipo I.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el segundo amortiguador de elución comprende al menos 2M de la sal inorgánica.
7. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque la sal inorgánica es cloruro de sodio.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el cromatógrafo de interacción hidrofóbica comprende un cromatógrafo de octil sefarosa.
9. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además una etapa de purificación con un cromatógrafo de intercambio de aniones.
10. El método de la reivindicación 9, caracterizado porque el cromatógrafo de intercambio de aniones comprende una membrana de intercambio de iones.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque comprende además someter las muestra a filtración con un filtro de nanopolar.
12. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque la filtración con el filtro de nanopolar se realiza antes de cargar la muestra al cromatógrafo por afinidad basado en STI.
13. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque la muestra purificada contiene menos de 1 % de proteínas contaminantes no expresadas por la construcción de polinucleótidos.

14. El método de cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el producto de polipéptido se expresa en una célula que contiene la construcción de polipéptidos.

15. El método de la reivindicación 14, caracterizado porque la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 100 mg del producto de polipéptido por litro de medio.

16. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 200 mg del producto de polipéptido por litro de medio.

17. El método de la reivindicación 15 o 16, caracterizado porque la muestra purificada contiene más de 50 % del producto de polipéptido producido en el medio.

18. El método de la reivindicación 15 o 16, caracterizado porque la muestra purificada contiene más de 100 mg del producto de polipéptido de cada litro de producción del medio.

19. El método de la cualquier reivindicación precedente, donde el producto de polipéptido es un polipéptido de dos cadenas que comprende una cadena ligera y una cadena pesada.

20. El método de la reivindicación 19, caracterizado porque 20 % a 50 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

21. El método de la reivindicación 20, caracterizado porque 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene dos glicosilaciones unidas a O y 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene una glicosilación unida a O.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, caracterizado porque 40 %-80 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

23. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque 90 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, caracterizado porque 2 %-12% del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-24, caracterizado porque 0,1 %-1,5 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-25, caracterizado porque 2 %-8 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-26, caracterizado porque 35%-60% del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

28. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una parte de polipéptido de polipéptidos de dos cadenas donde.

35 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

20 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

40 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y

menos de 10 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, caracterizada porque menos de 5 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

30. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, caracterizada porque menos de 3 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

31. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, caracterizada porque 0,1 %-1,5 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

32. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, caracterizada porque 2 %-8 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

33. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, caracterizada porque 30 %-70 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene dos glicosilaciones unidas a O.

34. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, caracterizada porque 30 %-70 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene una glicosilación unida a O.

35. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34, caracterizada porque 90 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O.

36. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 35, caracterizada porque la preparación está liofilizada.

37. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, caracterizada porque comprende además HCl de L-arginina o acetato de L-arginina.
38. La composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades 28 a 37, que comprende además sacarosa.
39. La composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades 28 a 38, que comprende además manitol.