



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0612943-9 A2**

(22) Data de Depósito: 12/04/2006
(43) Data da Publicação: 09/10/2012
(RPI 2179)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 1/30

(54) **Título:** MÉTODOS PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SURFACTANTE CATIÔNICO

(30) **Prioridade Unionista:** 11/04/2005 US 60/670.520

(73) **Titular(es):** Savient Pharmaceuticals, Inc.

(72) **Inventor(es):** Eliyahu Harosh, Meir Fischer

(74) **Procurador(es):** Nascimento Advogados

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006013751 de 12/04/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/051178de 02/05/2008

(57) **Resumo:** PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SURFACTANTE CATIÔNICO. A presente invenção provê um método para a purificação de uma proteína alvo de uma mistura compreendendo a proteína alvo e a proteína contaminada, compreendendo as etapas de exposição da mistura à uma efetiva quantidade de um surfactante catiônico de modo que a proteína contaminada seja preferencialmente precipitada e dessa forma recuperando a proteína alvo. As proteínas purificada, de acordo com o método da presente invenção são também providas.

16

“PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SURFACTANTE CATIÔNICO”

A presente invenção reivindica a prioridade e os benefícios do Pedido de Patente Norte-Americano Provisional No. 60/607.520 requerido em 11 de abril de 2005, cuja revelação está sendo incorporada à presente invenção por referência. A invenção se refere ao campo de purificação de proteína usando surfactantes. A produção biológica de moléculas, particularmente proteínas, frequentemente envolve etapas de intensificação de pureza baseadas em propriedades físicas e fisico-químicas. Dificuldades encontradas nas referidas etapas dos processos incluem, mas não se limitam à, determinar as condições que possibilitam a separação das moléculas solúveis e insolúveis, relativas à baixa recuperação da desejada molécula após uma etapa de tratamento, perda da atividade biológica no curso do processo, e sensibilidade da proteína para as condições da etapa do processo, como pH. Os surfactantes tem sido utilizados no processamento de macro-moléculas biológicas. Surfactantes catiônicos são uma reconhecida sub-classe de surfactantes, e incluem compostos de amônia anfipáticos. Os compostos de amônia anfipática compreendem compostos de amônia quaternária da fórmula geral QN^+ e compostos de amônia primária da cadeia de parafina da fórmula geral RNH_3^+ . Ambos tipos de compostos de amônia anfipática incluem surfactantes de amônia de grande cadeia, que tem uma grande cadeia alifática de preferivelmente pelo menos seis átomos de carbono (Scott (1960) Methods Biochem. Anal. 8:145-197, incorporado à presente, por referência, em sua integridade). Os surfactantes de amônia quaternária de grande cadeia são conhecidos por interagirem com as macro-moléculas biológicas. Os compostos de amônia quaternária de grande cadeia tem ao menos um substituto no nitrogênio que consiste de uma rede alquila linear com 6-20 átomos de carbono. Os mais conhecidos representativos dessa classe são os sais benzalcônios (cloretos e brometos), acetato de dequalínio cloreto hexadecilpiridínio, brometo de amônia cetildimetilamônia (CTAB) e cloreto de hexadecilpiridínio (COCI) e cloreto de benzetônio. Os surfactantes de amônia quaternária incluem sais como sais piridínios, como por exemplo, cloreto de piridínio cetila (CPC), sais metilpiridínios estearamida, sais piridínios laurílicos, sais quinolínios cetila, sais ésteres de ácido metila aminopropiônico laurílico, sais metais de ácido propiônico amino laurílico, betaína dimetila estearílico betaína

dimetila laurílico, betaína dihidroxietila laurílico e sais benzetônios. Os sais piridínios de alquila, compreendem sais de amônia estearílico-trimetila, cloreto de amônia dimetilabenzila-alquila, e cloreto de alquilamônia dicloro-benziladimetila. Conhecidos usos de surfactantes catiônicos para a purificação

5 de macro-moléculas biológicas incluem: 1) solubilização de agregados, incluindo proteínas agregadas; 2) eluição de macro-moléculas biológicas ligadas por colunas cromatográficas; e 3) precipitações dos poliânions, como o ácido hialurônico (HA), ácidos nucleicos, e heparina (e moléculas que co-precipitam com os poliânions). Os surfactantes catiônicos tem sido usados para a

10 solubilização de proteínas agregadas. Otta e Bertini (1975) *Acta Physiol. Latinoam.* 25:451-457, aqui incorporada por referência em sua integridade) demonstrou que a uricase ativa poderá ser solubilizada a partir de fígados de roedores peroxissomos com surfactante de amônia quaternária., Hyamine 2398. Foi encontrado que o aumento da concentração do surfactante de amônia

15 resultou no acréscimo da dissolução de ambas uricase (baseadas na atividade enzimática) e proteína total de modo que não haja nenhum aumento na quantidade relativa da proteína uricase com relação à quantidade da proteína total. Em outras palavras, não há seletiva solubilização da proteína uricase com relação à proteína total, e a proteína uricase não constituiu um alto percentual da

20 proteína total na solubilização com o surfactante catiônico. Assim neste processo, a pureza da uricase com relação ao conteúdo da proteína total é aparentemente não acentuado como um resultado da solubilização do surfactante da amônia quaternária. Em outro estudo, Truscoe (1967) *Enzymologia* 33: 1 19-32, incorporado à presente por referência em sua

25 integridade, examinou um painel de aniônico catiônico e detergentes neutros para sua eficácia na extração de oxidase de urato (uricase) a partir dos pós de rins ox. Enquanto os detergentes aniônicos e neutros eram encontrados para acentuar a atividade oxidase de urato solúvel, os detergentes catiônicos, por exemplo, sais de amônia quaternária, eram encontrados para reduzir a total

30 atividade enzimática com o aumento da concentração. Os autores concluíram que os detergentes catiônicos não foram adequados para a purificação da oxidase de ureto do rim ox. A solubilização das proteínas recombinadoras, suína, hormônio de crescimento, hormônio de crescimento metionila-suíno, proteína

18/

viral de doenças com infecções bursais, proteína de fusão B-galactosidase, de corpos de exclusão E. coli ou células, com surfactantes catiônicos é descrita nas Patentes Norte-Americanas No. 4.797.474, No. 4.992.531, No. 4.966.963 e 5.008.377, cada uma delas sendo incorporada à presente por referência em sua integridade. A solubilização sob condições alcalinas é acompanhada usando compostos de amônia quaternária incluindo cloreto de cetiltrimetilamônia, cloreto benzilamônia dimeetila misturado com n-alquila, CPC, cloreto de benzenemetamônia N,N-dimetil-N[2-2[-4-(1,1,3,3-tetrametilbutila)-fenoxietoxila-etila, brometo de trimetilamônia dodecila, brometo de trimetilamônia cetila. Essas publicações mencionam que, após cada processo de solubilização, as soluções são centrifugadas e pouco ou nenhum grânulo é observado em cada caso. Esta observação sugere que a maior parte ou todas as proteínas são solubilizadas sem levar em conta a seletividade para a solubilização de uma proteína alvo. A pureza das proteínas recuperadas não é indicada. A Patente Norte-Americana No. 5.929.231 incorporada à presente por referência em sua integridade, descreve a desintegração dos grânulos e agregados contendo amido do cloreto de piridínio cetila (CPC). Assim o conhecido pelo estado da técnica, relata o uso de surfactantes catiônicos em geral, não especificando a solubilização da partícula biológica das macro-moléculas. Esses métodos conhecidos pelo estado da técnica não revelam o aumento da pureza de uma desejada proteína alvo com relação à proteína total com um surfactante catiônico. Os surfactantes catiônicos tem também sido usados para iluir as macro-moléculas biológicas adsorvendo as resinas do intercâmbio de cátions ou adjuvantes contendo alumínio (Antonopoulos, et al., (1961) Biochim. Biophys. Acta 54: 231-266; Embery (1976) J. Biol. Buccale 4:229-236; e Rinella, et al. (1998) J. Colloid Interface Sci. 197: 46-56, cada um dos quais incorporado à presente por referência em sua integridade. A Patente Norte-Americana No. 4.169.764, ora incorporada à presente por referência em sua integridade, descreve a eluição da uroquinase das colunas de celulose carboximetila usando uma ampla variedade de soluções surfactantes catiônicos. Os autores estabelecem uma preferência para a utilização de um tetra (quatro) sais de amônia substituintes nos quais um grupo alquila por um mais alto grupo alquila com até 20 átomos de carbono e os outros inferiores grupos alquila com até 6 átomos de carbono. O uso dos

19

referidos surfactantes catiônicos possibilitam a remoção das macro-moléculas biológicas de sua fixação à uma sólida matriz. Contrariamente, a impregnação de filtros, como aqueles compostos de nylon, com surfactantes catiônicos possibilitando a imobilização de polissacarídeos ou ácidos nucleicos (Maccari and Volpi (2002) Electrophoresis 23:3270-3277; Benitz, et al., (1990), Patente Norte-Americana No. 4.945.086; Macfarlane (1991); Patente Norte-Americana No. 5.010.183, cada uma delas ora incorporadas à presente por referência em sua integridade. Esse fenômeno é aparentemente devido às interações do poliânion que possibilita a precipitação da poliânion. Deverá ficar bem estabelecido que os compostos de amônia anfipática, que compreendem compostos de amônia quaternária da formula geral QN^+ e os compostos de amônia da cadeia primária de parafina da fórmula geral RNH_3^+ , poderão precipitar os poliânions sob definidas condições (revista em Scott (1995) Biochim. Biophys. Acta 18:428-429; Scott (1960) Methods Biochem. Anal. 8:245-197; Laurent, et al., (1960) Biochim. Biophys. Acta 42:476-485; Scott (1961) Biochem. J. 81:418-424; Pearce e Mathieson (1967) Can. J. Biochemistry 45:1565-1576; Lee (1973) Fukushima J. Med. Sci. 19:33-39; Balazs, (1979) Patente Norte-Americana No. 4.141.973; Takemoto, et al., (1982) Patente Norte-Americana No. 4.312.979; Rosenberg (1981) Patente Norte-Americana No. 4.301.153; Takemoto, et al., (1984) Patente Norte-Americana No. 4.425.431; d'Hinterland, et al., (1984), Patente Norte-Americana No. 4.460.575; Kozma, et al., (2000) Mol. Cell. Biochem., 203: 103-112, cada uma delas incorporada à presente por referência em sua integridade. Esta precipitação é dependente em espécies tendo uma alta densidade de carga poliânion e alto peso molecular (Saito (1995) Kolloid-Z 43:66, incorporado à presente, por referência em sua integridade. A presença dos sais poderão interferir com o surfactante catiônico induzido pela precipitação dos poliânions. Adicionalmente, os poliânions poderão ser diferenciamente precipitados a partir das soluções contendo proteínas contaminadas sob condições de pH alcalinas. Nesses casos, as proteínas não quimicamente unidas aos poliânions permanecerão na solução, enquanto os poliânions e outras moléculas ligadas aos poliânions serão precipitadas. Por exemplo, a precipitação dos poliânions, como os polissacarídeos e ácidos nucleicos sendo acompanhados pela co-precipitação de moléculas, como proteoglicanos e proteínas interagindo com os poliânions

(Blumberg e Ogston (1958) Biochem. J. 68:183-188; Matsumara, et al., (1963) Biochim. Biophys. Acta 69: 574-576; Serafini-Fracassini, et al., (1967) Biochem. J. 105:569-575; Smith, et al (1984) J. Biol. Chem. 259:11046-11051; Fukus and Vlodasky (1994) Patente Norte-Americana No. 5.362.641, Hascall and Heinegard (1974) J. Biol. Chem. 249:4232-4241; 4242-4229, and 4250-4256; Heinegard mand Hascall (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165:427-441; Moreno, et al., (1988) Patente Norte-Americana No. 4.753.796; Lee et al., (1992) J. Cell. Biol. 116:545-557; Varelas, et al., (1995) Arch. Biochem. Biophys. 321: 21-30, cada uma delas sendo incorporada à presente por referência em sua integridade. O

5 ponto isoelétrico (ou pI) de uma proteína é o pH no qual a proteína tem um igual número de cargas positiva e negativa. Soluções com condições com valores de pH próximos à (especialmente abaixo) do ponto isoelétrico de uma proteína, ass

10 proteínas poderão formar estáveis sais, com resistentes ácidos poliânions como a herapina. Sob condições que promovam precipitação dos referidos poliânions, as proteínas complexadas com os poliânions também precipitam (LB Jacques (1943) Biochem. J. 37:189-195; AS Jones (1953) Biochim Biophys Acta 10: 607-612; JE Scott (1995) Chem and Ind 168-169, Patente Norte-Americana No.3.931.399 (Bohn, et al., 1976), e Patente Norte-Americana No. 4.297;344 (Schwinn, et al., 1981) todas incorporadas à presente por referência em sua

15 integridade). As Patentes Norte-Americanas No. 4.421.650, No. 5.633.227 e Smith, et al., (1984) J. Biol.Chem. 259:11046-11051 cada uma delas sendo incorporada à presente por referência e sua integridade, descrevem a purificação dis poliânions pelo seqüencial tratamento com um surfactante catiônico e sulfato de amônia (que capacita a dissociação dos complexos surfactantes catiônicos-

20 poliânions) e a subseqüente separação usando as interações cromatográficas hidrofóbicas. A Publicação da Patente Européia No. EP055199, ora incorporada à presente por referência e sua integridade, descreve a separação possibilitada pelo surfactante catiônico e sulfato de amônia (que possibilita a dissociação dos complexos surfactantes catiônicos-poliânions) e subseqüente preparação usando

25 interações hidrofóbicas cromatográficas. A Publicação da Patente Européia EP055188, sendo incorporada à presente por referência e sua integridade, descreve a separação possibilitada pelo surfactante catiônico da toxina RTX do lipo-polissacarídeo. Entretanto, não há balanço de massa na quantidade de lipo-

30

polissacarídeo que é quantificada pela análise da atividade endotoxina. A neutralização da atividade endotoxina pela resistente interação dos compostos catiônicos tem sido demonstrada (Cooper JF (1990) J Parenter Sci. Technol 44: 13-5, incorporada à presente por referência e sua integridade. Assim, na

5 EP055188 a ausência da atividade endotoxina precipita o seguinte tratamento com o aumento das quantidades dos surfactantes catiônicos possivelmente na neutralização da atividade pela formação do complexo surfactante-lipo-

10 polissacarídeo. Os métodos acima citados requerem inrtermediários poliânions, sólidos suportes ou agregados compreendendo proteínas com seletiva solubilidade por um surfctante catiônico para possibilitar de proteínas solúveis usando surfactante catiônico. Dessa forma, o estado da técnica conhecido não provê um método de purificação de uma proteína alvo pelo contato da proteína com um surfactante catiônico em uam quantidade efetiva para preferencial precipiração das proteínas outras que a proteína alvo, ou seja, as proteínas

15 contaminadas, particularmente quando o referido contato é feito na ausência de poliânions intermediários, sólidos suportes ou agregados das proteínas.

Frequentemente, um especialista no assunto encontrará misturas de proteínas solúveis e que não tenhma um simples, efetivo meio para a purificação da

20 desejada proteína. O novo método para purificação das proteínas, descrito aqui, possibilita eficiente purificação das proteínas padrão pelo uso de surfactantes catiônicos para preferencialmente precipita, proteínas outras do que a proteína alvo. Preferivelmente a referida precipitação das proteínas contaminadas é direta e não depende da presença de poliânions, sólidos suportes ou agregados

25 compreendendo as proteínas contaminadas e outras moléculas. A referida invenção provê um método para a purificação de uma proteína alvo de uma mistuta compreendendo a proteína alvo e a proteína contaminada, compreendendo as etapas de exposição da mistura em uma efetiva quantidade de surfactante catiônico de modo que a proteína contaminada seja

30 preferencialmente precipitada e recuperando a proteína alvo. Para uma melhor compreensão e entendimento da invenção, a mesma será descrita com relação aos desenhos em anexo, apresentados em caráter exemplificativo, mas não limitativo, nos quais:

22

- A Figura 1 representa os efeitos da concentração CPC na atividade e pureza da uricase. A concentração da proteína (A) e a atividade enzimática (B) da uricase mamífera, dos corpos de inclusão dissolvidos E. coli, são medidos seguindoos indicados tratamentos CPC e separação centrífuga. A específica
- 5** atividade (C) de cada isolado é calculada em um raio ou proporção desses valores (atividade/concentração da proteína);
- A Figura 2 representa o tamanho da exclusão da análise cromatográfica HPLC da uricase mamífera bruta preparada dos corpos de inclusão e seguindo o tratamento com 0.075% de CPC. O tamanho da exclusão doe perfis HPLC de A.
- 10** solubilizado dos corpos de inclusão E. coli sem o tratamento CPC, e B, o flutuante seguindo COC (0.075%) e o percentual total da área resumida nas tabelas adjacentes;
- A Figura 3 representa a análise SDS-PAGE (15% gel) da uricase tratada CPC. As amostras contendo uricase são preparadas como descrito no Exemplo 1.
- 15** Amostras de várias etapas de processos são aliquoteadas como se segue: Lote 1 – IBs dissolvido; Lote 2 – Flutuante após o tratamento CPC; Lote 3 – grânulo após o tratamento CPC;
- A Figura 4 representa o tamanho da análise de exclusão HLPC do anti-corpo scFv bruto seguindo o tratamento com CPC. Os perfis do tamanho da exclusão
- 20** HPLC de A. Referência do anti-corpo padrão BTG-271 scFv, dos corpos de inclusão solubilizados B. e o flutuante C. seguindo a redobragem da precipitação e filtragem do CPC (0.02%) que são analisadas. A área de cada pivo do percentual da área total são sumarizados nas tabelas adjacentes;
- 25** - A Figura 5 representa a análise SDS-PAGE (15% gel) di anti-corpo scFv tratado com CPC. O anti-corposcFv contendo amostras de várias etapas de processos e padrões são representados na seguinte ordem; Lote 1 – padrões de peso molecular. – Lote 2 – IBs dissolvido; Lote 3 – proteína redobrada; Lote 4 – grânulo CPC; Lote 5 – flutante apóso tratamento CPC;
- 30** - A Figura 6 representa a cromatografia da filtragem di gel HPLC di beta interferon antes e após o tratamento com CPC.
- A. Antes do tratamento CPC
- B. Após o tratamento CPC

200 µl de uma solução de 0.1mg/ml de beta interferon que foi carregado na coluna.

As proteínas são eletrolíticos, tendo cargas positiva e negativa. O pH de uma solução e as moléculas carregadas que interagem com o impacto da rede de carga daquela proteína. Fortes interações entre as proteínas poderão ocorrer quando a rede da carga de uma proteína for neutra (o ponto isoelétrico). Quando

o pH da solução for inferior ao ponto isoelétrico da proteína, a proteína tem uma rede de carga positiva, e poderá haver repulsão eletrostática entre as moléculas catiônicas, incluindo outras proteínas. É um objetivo da presente invenção,

prover um método para a purificação de uma proteína padrão solubilizada de uma solução compreendendo uma mistura da proteína alvo e as proteínas contaminadas compreendendo a mistura solubilizada com uma efetiva quantidade um surfactante catiônico e recuperando a proteína alvo. Surfactantes catiônicos são moléculas ativas superficiais com uma carga positiva. Em geral,

esses compostos também tem pelo menos um grupo alifático não-polar. Preferivelmente a proteína alvo tem um ponto isoelétrico maior do que 7. Em uma particular incorporação, o pH da solução é aproximadamente o mesmo do ponto isoelétrico da proteína alvo. Em uma preferida incorporação, o pH da solução é menor do que o ponto isoelétrico da proteína alvo. Em uma particular

incorporação da invenção, quando o pH da solução for superior ao ponto isoelétrico da proteína alvo, o pH da solução estará dentro de 1-2 unidades de pH do ponto isoelétrico da proteína alvo. Em uma particular incorporação da invenção, quando o pH da solução estiver acima do ponto isoelétrico da proteína alvo, o pH da solução estará dentro de uma unidade de pH do ponto isoelétrico

da proteína alvo. Em uma particular incorporação da invenção, a proteína ou proteínas contaminadas são preferencialmente precipitadas, e dessa forma aumentando a proporção da proteínas permanecendo na solução representada pela proteína alvo. Por exemplo, iniciando-se de uma solução da proteína alvo e da proteína contaminada onde a proteína alvo é 20% da proteína total em

solução, uma poderá purificar a proteína alvo usando os métodos providos para se alcançar uma solução onde a proteína alvo é 30% ou mais, 40% ou mais, 50% ou mais, 60% ou mais, 70% ou mais, 80% ou mais 90% ou mais ou 95% ou mais da proteína total permanecendo na solução. Como usado aqui, o termo

24

“preferencialmente precipitado(a) significa que um proteína ou um grupo de proteínas são precipitadas para uma maior extensão do que outra proteína ou grupo de proteínas. Por exemplo, no caso de uma mistura de uma proteína alvo e das proteínas contaminadas, as proteínas contaminadas são preferencialmente precipitadas com relação à proteína alvo quando 20% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que menos do que 20% da proteína alvo é precipitada. Preferivelmente, um alto percentual de proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto um baixo percentual da proteína alvo é precipitada. Em uma particular incorporação da invenção, 30% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto menos do que 30% da proteína alvo é precipitada; 40% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que menos do que 40% da proteína alvo é precipitada; 50% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que 50% ou menos da proteína alvo pe precipitada; 60% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que 60% ou menos da proteína alvo é precipitada; 70% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que 70% ou menos da proteína alvo é precipitada; 80% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto que 80% ou menos da proteína alvo é precipitada; 90% ou mais das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto 90% da proteína alvo é precipitada; 95% das proteínas contaminadas são precipitadas, enquanto 95% ou menos da proteína alvo é precipitada. Preferivelmente, um pequeno percentual da proteína alvo é precipitada. Por exemplo, menos do que 60%, menos do que 50%, menos do que 40%, menos do que 30%, menos do que 20%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1% da proteína alvo é precipitada. Em uma particular incorporação da invenção,

A quantidade total da proteína em solução (proteína alvo mais a proteína contaminada) antes de realizar o método de purificação desta invenção, é de 0.1 à 10 mg/ml. Em uma particular incorporação da invenção, a quantidade total de proteína na solução antes da realização do método de purificação da invenção é de 0.1 à 3 mg/ml, 0.3 à 3 mg/ml. 0.5 à 2 mg/ml, 1 à 2 mg/ml, ou aproximadamente 1 mg/ml. Em uma particular incorporação da invenção, a preferencial precipitação das proteínas contaminadas é direta, e não depende,

ou não substancialmente depende, da presença de poliânions. Em uma particular incorporação da invenção, a preferencial precipitação das proteínas contaminadas é direta, e não depende ou não substancialmente depende da presença de um suporte sólido. Em uma particular incorporação da invenção, a preferencial precipitação das proteínas contaminadas não depende, ou substancialmente não depende da presença de agregados entre as proteínas contaminadas e outras moléculas. A preferencial precipitação das proteínas contaminadas não depende ou substancialmente não depende de um componente (comon por exemplo, poliânions, suportes sólidos, ou agregados de proteínas contaminadas e outras moléculas) quando, por exemplo, a remoção daquele componente não afete ou não substancialmente não afete, respectivamente, a preferencial precipitação da proteína contaminada. Um exemplo de um não substancial efeito da remoção de um componente seria de que as proteínas contaminadas são preferencialmente precipitadas tanto quando o componente é ausente ou quando está ausente. Um adicional exemplo seria as proteínas contaminadas serem preferentemente precipitadas na mesma extensão quando o componente estiver presente e quando estiver ausente. Preferivelmente, a mesma, ou substancialmente a mesma quantidade de proteínas são precipitadas na ausência ou substancial ausência do componente como na presença do componente. Em outra incorporação, o método é realizado na ausência de poliânions ou na substancial ausência de quantidade de poliânions. Em uma particular incorporação da invenção, o método é realizado na ausência de um suporte sólido ou na substancial ausência de um suporte sólido. Em uma particular incorporação da invenção, o método pe realizado na ausência de agregados entre as proteínas contaminadas e outras moléculas, ou na substancial ausência de quantidade de agregados entre as proteínas contaminadas e outras moléculas. Preferivelmente, o método é realizado na ausência ou na substancial ausência de dois ou três membros do grupo consistindo de poliânions; um suporte sólido; e agregados entra as proteínas contaminadas e outras moléculas. Uma vez provido o método da invenção, será uma rotina para um especialista na matéria, selecionar o particular surfactante usado e as condições, como por exemplo, pH, temperatura, salinidade, concentração de surfactante catiônico, concentração da proteína

total, sob as quais este procedimento será acompanhado para possibilitar a eficiência da purificação de uma particular proteína alvo. Por exemplo, purificações realizadas em diferentes valores de pH, e concentrações de surfactante poderão ser comparadas para estabelecer as condições de purificação ideais. Exemplos deste procedimento são providos abaixo na seção de exemplos. Em uma particular incorporação da invenção,

O pH da solução é escolhido de maneira que ele seja tão alto quanto possível sem substancialmente reduzir a quantidade da proteína alvo recuperada. É ainda um objetivo da invenção, prover um método para determinar as condições que

viabilizem eficiente purificação das proteínas alvo na base de suas solubilidades, quando impactadas pelos surfactantes catiônicos. Uma efetiva quantidade de surfactante catiônico é uma quantidade de surfactantes que cause a preferencial precipitação das proteínas contaminadas. Em uma particular incorporação da invenção, a efetiva quantidade dos surfactantes precipitados 40%, 50%, 60%,

70%, 80%, 90%, 95% ou 99% das proteínas contaminadas. Em uma particular incorporação da invenção, o surfactante catiônico é adicionado à concentração de 0.001% à 5.0%, preferivelmente o surfactante catiônico é adicionado à uma concentração de 0.01% à 0.5% e mais preferivelmente, o surfactante catiônico é adicionado à uma concentração de 0.03% à 0.2%. Em uma particular

incorporação da invenção, o surfactante catiônico é adicionado à uma concentração de 0.01% à 0.1%, 0.01% à 0.05% ou 0.01% à 0.03%. Em uma particular incorporação da invenção, o método acima mencionado é acompanhado quando o surfactante é um composto de amônia anfipático. Em uma particular incorporação da invenção, a proteína alvo solubilizada está sujeita

ainda ao processamento após as proteínas contaminadas terem sido preferencialmente precipitadas. Como referido processamento poderá incluir adicionais etapas de purificação, análises para atividade, ou concentração, diálise cromatográfica (como por exemplo, o tamanho da exclusão cromatográfica) eletroforese, diálise, etc.. Como usado aqui, os compostos de

amônia anfipáticos compreendem compostos tendo ambos componentes catiônicos polar e não polar com a fórmula geral QN^+ ou RNH_3^+ . Q indica que o nitrogênio é a amônia quaternária (equivalentemente ligado à quatro grupos orgânicos que podem ou não serem ligados uns aos outros). Quando os grupos

orgânicos são ligados uns aos outros, eles podem formar compostos aromáticos ou alifáticos cíclicos, dependendo da configuração eletrônica das ligações entre os componentes que formar a estrutura cíclica. Quando o composto de amônia anfipática selecionado tem uma fórmula geral RNH_3^+ , o composto é uma amina primária onde R é um grupo alifático. Os grupos alifáticos são grupos orgânicos de cadeia aberta. Em uma incorporação da presente invenção, o selecionado composto de amônia anfipática poderá formar um sal com uma halida. Comumente, os sais halida se referem àqueles compreendendo fluoreto, cloreto, brometo e íons de iodo. Em uma incorporação da presente invenção, um

5 composto de amônia anfipático tem ao menos uma cadeia alifática tendo 6-20 átomos de carbono, preferivelmente o composto de amônia alifática tendo 8-18 átomos de carbono. Em uma incorporação da presente invenção, o selecionado composto de amônia anfipática é selecionado de um grupo de sais piridínicos cetila, sais metilapiridínicos estereamidas, sais piridínicos laurílicos, sais quinolínicos cetila, sais ésteres de ácido metila aminopropiônico laurílico, sais metila de aminoácido propiônico laurílico, betaína dimetila laurílica, betaína dimetila estéril, betaína dihidroxietila laurílica e sais benzetônio. Os compostos de amônia anfipática que poderão ser usados incluem, mas não se limitam à actato dequalínio cloreto hexadecilpiridínio, cloreto hexadecilpiridínio, cloreto cetiltrimetilamônia, cloreto benzilamônia dimetila alquila-n misturado, cloreto de piridício cetila (CPC), cloreto de benzenemetamônia-N,N-dimetilapN-[2-[2-[4-(1,1,3,3,tetrametilabutila)-fenolia]eetoxila, cloreto de amônia dimetilabenzila-

10 alquila, e cloreto beziladimetila-diclororo, brometo trimetilamônia tetrdecila, brometo trimetilamônia dodecila, brometo trimetilamônia cetila,,betaína estéril

15 betaína dimetila laurílico, e betaína dihidroxietila laurílico. Em uma incorporação da presente invenção, o composto de amônia anfipática é um sal cetilapiridínio como o cloreto de cetilapiridínio. Em uma incorporação da presente invenção, a mistura contendo a desejada proteína ainda compreende componentes celulares como componentes celulares derivados microorganismos, por exemplo,

20 bactéria, como E. coli. Em uma incorporação da presente invenção, os componentes celulares são uma ou mais proteínas. Em uma incorporação da presente invenção, a proteína alvo poderá ser uma proteína recombinadora, por exemplo, uma enzima. O método da invenção poderá ser usado para purificar

25

30

uma variedade de proteínas. Essas proteínas poderão inclui, mas não se limitando à, anti-corpos, uricase, beta-interferon, inibidor parasita fator X, ácido deoxibonuclease II, elastase, lisozima, papaína, peroxidase, ribonuclease pancreática, tripsina tripsinogênica, citocromo-c, erabutoxina, estafilococcus aureo enterotoxina C1, e oxidade monoamina A, e outras proteínas que são positivamente carregadas sob condições alcalinas. Em uma incorporação da presente invenção,

A proteína alvo poderá ser um anti-corpo, receptor, enzima, proteína de transporte, hormônio ou fragmento dos mesmos ou um conjugado, por exemplo, conjugado à uma segunda proteína ou produto químico ou uma toxina. Os anti-corpos incluem, mas não se limitam, à monoclonal, humanizado, quimérico, cadeia única, bi-específico, fragmentos F(ab')₂, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão Fab, anti-corpos anti-idiotípico (anti-Id) e fragmentos ligando epítipo de qualquer um dos acima mencionados, mas com a provisão de que em certas condições de purificação do anti-corpo é positivamente carregado.

Para a preparação de anti-corpos monoclonais, qualquer técnica que provenha a produção de moléculas anti-corpo pela contínua cultura da linhas de célula poderá ser usada. Isto inclui, mas não se limita à técnica hibridoma de Kohler e Milstein, (1975, Nature 256, 495-497; e a Patente Norte-Americana No. 4.376.110), a técnica hibridoma célula-B, (Kozbor et al., 1983, Immunology today 4, 72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030) e a técnica hibridoma-EBV para produzir anti-corpos monoclonais humanos (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R, Liss, Inc., pp-77-96).

Referidos anti-corpos poderão ser usados como a base a partir da qual o clone onde as cadeias leves e pesadas se expressam individualmente ou foram recombinante. As duas cadeias poderão ser recombinantemente expressadas na mesma célula ou combinadas in vitro após separar a expressão e a purificação. Os ácidos nucleicos, por exemplo, um vetor plasmídeo), codificando uma desejada cadeia leve ou pesada ou codificando uma molécula compreendendo uma desejada cadeia leve ou pesada de domínio variável poderá ser transfectada em uma célula expressando uma cadeia leve ou pesada de um distinto anti-corpo ou molécula compreendendo um anti-corpo leve ou pesado, para a expressão de uma proteína multimérica. Alternativamente, cadeias

29/

pesadas ou moléculas compreendendo a variável região das mesmas ou um CDR das mesmas poderá opcionalmente ser expressada e usada sem a presença de uma complementar região variável de cadeia leve ou pesada. Em outras incorporações, como os anti-corpos e as proteínas poderão ser

5 modificadas terminal-C ou N, como por exemplo, pela amidação terminal-C ou pela acetilação terminal-N. Um anti-corpo quimérico é uma molécula na qual diferentes partes são derivadas das diferentes espécies de animais, como àquelas tendo uma variável região derivada de uma murina AB e uma região constante imunoglobina constante. (ver, por exemplo, Cabilly et al., a Patente

10 Norte-Americana No. 4.816.567; e Boss et al., Patente Norte-Americana No. 5.816.397). Técnicas para a produção de anti-corpos quiméricos incluem o entrançamento de genes de uma molécula de um anti-corpo de um camundongo de apropriado específico antígeno juntamente com outros genes de uma molécula de anti-corpo humano de uma apropriada atividade biológica (ver por

15 exemplo, Morrison, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81,6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312,604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314,452-454). Anti-corpos humanizados são moléculas de anti-corpos de espécies não humanas tendo uma ou mais regiões complementares regiões determinantes (CDRs) de espécies não humanas e regiões de estruturas de uma molécula imunoglobina

20 humana. Técnicas para a produção de anti-corpos humanizados são demonstradas por exemplo, Queen, Patente Norte-American No. 5.585.089 e Winter, Patente Norte-Americana No. 5.225.539. A extensão das regiões de estrutura e os CDRs tem sido precisamente definidas (ver, "Seqüências de Proteínas de Interesse Imunológico", Kabat, E. et al., e U.S. Department of

25 Health and Human Services (1983). Uma vez que os anti-corpos em cadeia são formados pela ligação dos fragmentos da cadeia leve e pesada da região Fv via uma ponte de aminoácido, resultando em uma única cadeia polipéptido. Técnicas para a produção de uma única cadeia de anti-corpos são descritas, por exemplo, na Patente Norte-Americana No. 4.946.778; Bird, 1988, Science 242,423-426;

30 Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; e Ward, et al., 1989, Nature 334,544-546). Um anti-corpo bi-específico pe geneticamente contruído com um anti-corpo que reconheça dois tipos de alvos, como por exemplo, (1) um epítipo e (2) uma molécula "disparadora", como por exemplo

receptores Fc em células mielóides. Referidos anti-corpos bi-específicos poderão ser preparados ou por conjugação química ou por hibridoma, ou técnicas biológicas moleculares recombinadoras. Os fragmentos de anti-corpos incluem, mas não se limitam à: Fragmentos F(ab')₂, que podem ser produzidos pela digestão pepsina da molécula do anti-corpo e fragmentos F(ab'), que podem ser gerados pela redução das pontes de bissulfeto dos fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, a expressão Fab poderá ser construída (Huse et, al., 1989m Science 246,1275-1281) para permitir rápida e fácil identificação dos fragmentos Fab monoclonais com a desejada especificidade. Em uma incorporação da presente invenção, a proteína é uricase. Em uma incorporação da presente invenção, a uricase é uma uricase mamífera. Em uma incorporação da presente invenção, a uricase mamífera é uma variante da uricase mamífera. Em uma incorporação da presente invenção, a uricase mamífera é uma uricase suína. Em outra incorporação da presente invenção, a uricase suína variante é designada pela uricase PKSDN. Em uma incorporação da presente invenção, a proteína é um anti-corpo. Em outra incorporação da presente invenção, o anti-corpo é um único anti-corpo de cadeia. Em uma incorporação da presente invenção, a proteína é um interferon. Em uma incorporação da presente invenção, o interferon é beta interferon. Em uma particular incorporação, o interferon é um beta interferon 1b. Bagolam S et al., Nature 284:316 (1980); Geddel, D.V et al., Nature, 287:411 (1980); Yelverton, E. et al., Nuc. Acid Res., 9:731 (1981); Streuli, M. et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.); 78:2848 (1981); Pedidos de Patente Européias No. 28033, publicado em 06 de maio de 1981; 321134, publicado em 15 de julho de 1981, 34307 publicado em 26 de agosto de 1981. Patente Belga No. 837379, concedida em 01 de julho de 1981 descrevendo vários métodos para a produção do beta-interferon empregando as técnicas DNA recombinadoras. Procedimentos para a recuperação e purificação bacteriana produzindo IFNs são descritos nas Patentes Norte-Americanas No. 4.450.103; No. 4.315.852; 4.343.735; e 4.343.736y, E Derynck et al., Nature (1980) 287: 193-197 e Scandella e Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971). Em uma incorporação da presente invenção, a proteína alvo é um parasita fator Xa. O parasita fator Xa poderá ser produzido por qualquer método conhecido pelo estado da técnica, como o método descrito na Patente Norte-Americana No. 6.211.341 e na Publicação da

Patente Internacional No. WO04/23735. Em uma incorporação da presente invenção, o contato é feito aproximadamente entre 1 minuto e 48 horas, mais preferivelmente entre 10 minutos à 24 horas, aproximadamente entre 30 minutos à 12 horas, aproximadamente 30 minutos à 8 horas, aproximadamente 30 minutos à 6 horas, aproximadamente 30 minutos à 4 horas, aproximadamente 30 minutos à 2 horas, aproximadamente 30 minutos à 1 hora, ou aproximadamente 1 à 2 horas. Em uma incorporação da presente invenção, o contato é feito a uma temperatura entre 4° C e 36° C, mais preferivelmente entre 4° C e 26° C.

5 A referida invenção ainda provê o uso de um surfactante catiônico como um único agente para a purificação de uma proteína tendo um ponto isoelétrico maior do que 7 sob condições alcalinas. A referida invenção provê ainda uma uricase purificada sob condições alcalinas de uma mistura pela adição do cloreto de cetilpiridínio à mistura. Em uma incorporação da presente invenção, a uricase
15 é obtida a partir de uma célula bacteriana compreendendo uricase codificando o DNA por um método compreendendo o tratamento da célula bacteriana de modo a expressar o DNA e produzir a uricase e recuperar a uricase.

Em uma incorporação da presente invenção, a uricase é recuperada a partir de precipitações dentro da célula bacteriana. A referida invenção também provê uricase purificada para uso na preparação de um conjugado uricase-polímero. A
20 invenção também provê uma proteína purificada tendo um ponto isoelétrico maior do que 7 obtido por um método compreendendo contato com uma mistura contendo a proteína com uma efetiva quantidade de surfactante catiônico sob
25 condições de modo que a proteína seja positivamente carregada, ou tenha uma área de carga positiva, recuperando a proteína. A referida invenção ainda provê o uso de um sal cetilpiridínio para a purificação de uma proteína tendo um ponto isoelétrico maior do que 7. Quanto ao pH, nas incorporações onde a mistura é contatada com uma efetiva quantidade de um surfactante catiônico sob
30 condições de modo que a proteína alvo seja positivamente carregada, o pH variará com a natureza da proteína alvo. Entretanto, o pH é preferivelmente entre pH 7 e pH 11, preferidos limites estão entre pH 7 à pH 10, pH 7 à pH 9, e pH 8 à pH 11, pH 8 à pH 10 ou pH 8 à pH 9.

EXEMPLOS

Os exemplos que seguem são estabelecidos para auxiliar no entendimento da invenção mas não pretendem e não deverão ser construídos para limitar o escopo da invenção.

5 **EXEMPLO 1. Uso do CPC para a Purificação da Uricase Mamífera Recombinadora**

1.1 Prática

A grade da uricase farmacêutica deve ser essencialmente livre de proteína não uricase. A uricase mamífera (ponto isoelétrico de 8.67) produzido em *E. coli* acumulada intra-celularmente em precipitações similares à organelas referidas como corpos de inclusão (IBs) que poderão ser facilmente isoladas para adicional purificação. E, contraste à vista clássica que o IBs contém, proteína expressa misturada/embaralhada, esses elementos tipo IB contendo correta uricase dobrada de forma precipitada. A exposição dos elementos tipo IB para um alcalino pH, como por exemplo de aproximadamente pH 9-11, re-dissolvida a proteína precipitada. O conteúdo da uricase nos elementos tipo-IB solubilizados foi de aproximadamente 40-60% e requerendo extensiva purificação para obter uma preparação de uricase homogênea. Aqui se demonstra a purificação da uricase e outra proteína com CPC que possa ser acessada por uma variedade de métodos. Por exemplo, a pureza da uricase mamífera poderá ser acessada pela determinação da específica atividade, o número de bandas seguindo a eletroferese e tingindo os gels SDS-PAGE e o número do tamanho do picos que aparecem em um cromatograma seguindo o tamanho da exclusão HPLC.

25 **1.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

1.2.1 50nM de Isolante NaHCO_3 (pH 10.3)

Este isolante foi preparado pela dissolução do NaHCO_3 para uma concentração final de 50 nM. O pH foi ajustado para 10.2 – 10.4. Dependendo do inicial pH, 0.1 M HCl ou 1 N NaOH poderá ser usado.

30 1.2.2. 10% de Solução CPC

10% de CPC foi preparadp pela dissolução do CPC em água destilada para uma concentração final de 10 gr/100ml.

1.2.3. Expressão da Uricase Suína Recombinadora

A uricase mamífera recombinadora (oxidase de ureto) foi expressada em *E. coli* K-12 na composição W3110F, como descrito na Publicação da Patente Internacional No. WO00/08196 de Duke University e Pedido de Patente Norte-Americano Provisional No. 60/095.489 incorporadas à presente, por referência em sua integridade.

1.2.4 Cultura e Colheita da Uricase Produzindo Bactéria

A bactéria foi cultivada à 37° C em crescimento médio contendo hidrolisato de caseína, extrato de levedura, sais, glicose e amônia. Seguindo a cultura, a bactéria na qual a uricase acumulada foi colhida por centrifugação e lavada com água para remover a média cultura residual.

1.2.5. Rompimento da Célula e Recuperação

O grânulo da célula colhida foi suspenso em 50mM de um isolante Tris, pH 8.0 e 10mM de EDTA, trazendo um final volume de aproximadamente 20 vezes o peso da célula seca (DCW). O lisossoma, em uma concentração de 2000-3000 unidades/ml foi adicionado ao grânulo suspenso enquanto era misturado, e incubado por 16-20 horas à 4 – 8° C. O lisato da célula foi tratado pela alta mistura e pela subsequente sonicação. A suspensão foi diluída, com um volume igual de água deionizada e centrifugada. O grânulo, contendo corpos de inclusão de uricase, foi diluído com água deionizada (w/w) e centrifugada para ainda remover impurezas. O grânulo obtido desta última etapa de lavagem, foi resguardado para adicional processamento, e o flutuante foi descartado.

1.2.6. Dissolução

O grânulo do corpo de inclusão (IB) foi suspenso em 50mM do isolante NaHCO₃, pH 10.3±0.1. A suspensão foi incubada em uma temperatura de 25±2° C por aproximadamente 0.5 – 2 horas para permitir a solubilização da uricase derivada-IB.

1.2.7. Tratamento CPC

10% de solução CPC foi adicionada em alíquotas para IBs homogenizados (pH 10.3), enquanto rapidamente se misturava, para obter a desejada concentração CPC. A amostra foi incubada por 1 à 24 horas como indicado, durante o que flocos de precipitação foram formados. A amostra foi centrifugada por 15 minutos à 12.000 x g. O grânulo e o flutuante foram separados, e o grânulo foi suspenso com 50mM do isolante NaHCO₃ ao volume original. A atividade enzimática de

cada fração foi determinada, e as frações foram concentradas e dializadas para remover o remanescente CPC.

1.2.8. Análise da Proteína

O conteúdo da proteína das alíquotas das amostras IB tratadas e não tratadas foi determinado usando o modificado método Bradford (Macart e Gebaut (1982) Clin Chim Acta 122:93-101).

1.2.9. Análise da Uricase

1.2.9.1 Atividade Enzimática

A atividade da uricase foi medida pelo método UV (Fridovich, I (1965). A competitiva inibição da uricase pelo oxonato e pelos relativos derivativos de triazinas-s. J Biol Chem, 240, 2491-2494; modificada pela incorporação de 1mg/ml BSA). A taxa da reação enzimática foi determinada, em amostras duplicadas, pela medição do decréscimo na absorção em 292 nm resultada da oxidação do ácido úrico para alantoína. Uma unidade de atividade pe definida como a quantidade da uricase requerida para oxidar um μ mole de ácido úrico por minuto, à 25° C, em específicas condições. A potência da uricase é expressada nas unidades da atividade por mg de proteína (U/mg). O coeficiente de extinção de 1mM de ácido úrico em 292 nm em 1 cm de comprimento de atalho é de 12.2. Assim sendo, a oxidação de 1 μ mole de ácido úrico por ml da reação da mistura resulta em um decréscimo na absorção de 12.2mA₂₉₂. A alteração da absorção cm tempo ($\Delta\Delta_{292}$ por minuto) foi dereivada da parte linear da curva. A atividade da uricase foi então calculada da seguinte forma:

$$\text{Atividade (U/ml)} = \frac{\Delta\Delta_{292} (\text{AU/min} \times \text{DF} \times V_{\text{RM}}}{V_s \times 12.2}$$

Onde DF = Fator de Diluição

V_{RM} = Volume Total da mistura da reação (em μ l)

V_s = Volume da amostra diluída usada na mistura da reação (em μ l)

1.3.9.2. Análise do HPLC com Superdex 200

A quantidade e relativa percentagem da enzima uricase nativa, bem como dos possíveis contaminantes, foram codificadas de acordo com o perfil de eluição obtido pelo HPLC usando uma coluna Superdex 200. Amostras duplicatas da solução uricase foram injetadas na coluna. As áreas de cada pico e a percentagem da área total foram automaticamente calculadas e sumarizadas nas tabelas adjacentes.

1.2.10. Análise SDS-PAGE

Proteínas em amostras contendo ~20µ de linha de proteína, foram separadas em 15% d SDS-PAGE gels. Os gels resultantes foram tingidos com Coomassie azul brilhante. Os efeitos do tratamento CPC (0.0005-0.075%) (para 1-24 horas) na atividade uricase recuperada no flutuante, e sua pureza são apresentadas na Tabela 1 e Figura 1. Antes do tratamento CPC (em pH 10.3), a concentração da proteína foi de 1.95 mg/ml, e a específica atividade enzimática foi de 3.4-4.67 U/mg. Os resultados apresentados na Figura 1B indicam que dentro de cada período de incubação, a concentração da proteína foi de 1.95 mg/ml, e a específica atividade enzimática foi de 3.4-4.67 U/mg. Os resultados apresentados na Figura 1B indicam que dentro de cada período de incubação, a concentração da proteína do flutuante decresceu com o aumento da concentração do CPC. Ao menos do que 0.04% de CPC. Um relativo menor efeito da concentração da proteína foi observado. O CPC, em concentrações de 0.04% {a 0.075%, poderá reduzir a concentração de proteína à aproximadamente 50% da concentração original. Em contraste aos efeitos do CPC na concentração da proteína total, a atividade da uricase solúvel total, não foi significativamente influenciada pelo aumento da concentração do CPC e o tempo de incubação (Fig. A). Dentro de cada período de incubação, a atividade enzimática específica (Fig. 1C) consistentemente foi aumentada como uma função do CPC dentro do limite de 0.04% à 0.075%. Este aumento foi um resultado da específica remoção das proteínas não uricase. Uma vez que a específica atividade enzimática da final atividade enzimática purificada foi de aproximadamente 9 U/mg, a maioria das proteínas contaminadas foram removidas por precipitação COC. De fato, as análises HPLC e SDS-PAGE realizadas chegaram a essa conclusão.

TABELA 1. EFEITO DA EXPOSIÇÃO DO CPC NA ATIVIDADE DA URICASE ESPECÍFICA E PUREZA

Tempo de Incubação (hr)	[CPC](%)	Atividade da uricase (U/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Atividade Específica da Uricase (U/mg)
1	0 (carga)	6.63	1.95	3.4
1	0.005	7.1	1.8	3.9

1	0.01	6.63	1.75	3.7
1	0.02	6.63	1.75	3.7
1	0.04	6.4	1.47	4.35
1	0.06	5.9	0.95	6.2
1	0.075	6.4	0.9	7.1
4	0.005	8.61	1.7	5.06
4	0.01	8.36	1.66	5.04
4	0.02	8.36	1.6	5.04
4	0.04	7.38	1.32	5.59
4	0.06	6.4	0.9	7.1
4	0.075	6.9	0.82	8.4
24	0.005	8.8	1.9	4.66
24	0.01	7.9	1.9	4.14
24	0.02	7.9	1.9	4.14
24	0.04	7.3	1.5	4.9
24	0.06	6.9	0.97	7.1
24	0.075	6.9	0.9	7.4
24	0 (carga)	9.1	1.95	4.67

1.4. Confirmação da Acentuação do CPC na Pureza da Uricase

A uricase contendo IBs foram isolados e solubilizados, como descrito na seção 1.3.. Amostras do material solúvel foram analisadas antes do tratamento CPC e seguindo de filtragem da proteína precipitada-CPC.

5 1.4.1. Análise HPLC de proteínas não uricase seguindo tratamento com 0.075% de CPC

10 A análise do HPLC do IBs solubilizado indicarm que o pico da uricase associada (tempo de retenção (RT) ~ 25.5 minutos compreende aproximadamente 46% da proteína da amostra IB bruta (Fig. 2A). Seguindo o tratamento CPC o pico da uricase associada aumentou em aproximadamente 92% da proteína (Fig. 2B), e foi acompanhada pela significativa redução dos contaminantes eluindo entred RT 15 – 22 minutos (Figura 2 A). A área do pico da uricase é de aproximadamente 70% daquela da Figura 2A. Assim, esses resultados indicam a pureza da uricase duplicada resultante da remoção da proteína não uricase no tratamento

15 CPC.

1.4.2. Efeito de 0.075% do CPC na atividade enzimática

Os resultados (apresentados na Tabela 2) indicam que o balanço da atividade uricase foi retida durante o processo de tratamento. A exposição do CPC foi encontrada para precipitar 60% de todas proteínas em solução. Mais do que 85% da atividade enzimática permaneceu na solução, e assim a remoção da proteína estranha propiciando um aumento da atividade específica do flutuante produzido de mais dos que 110%. Em processos mais sofisticados, algumas das atividades desejadas permaneceram no grânulo. Nesta instância, somente 17.6% da atividade original permaneceu no grânulo (e foi extraída usando 50mM de bicarbonato de sódio (7 mSi, pH 10.3) para propósitos analíticos) os quais são uma fração relativamente menor à quantidade total.

TABELA 2. EFEITO DO TRATAMENTO CPC NA ATIVIDADE DA URICASE

Amostra	Atividade Total (U)	Atividade (U/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)
Antes do CPC	490	4.9	2	2.46	100
Após o tratamento CPC	418	4.18	0.8	5.2	85.3
Grânulo após o Tratamento CPC	86	0.8	-	-	17.6

1.4.3. Análise SDS-PAGE Seguindo o Tratamento com 0.075% de CPC

Amostras da uricase bruta, antes da exposição ao CPC, e das subseqüentes frações, seguindo a separação do material solúvel e insolúvel, e a reconstituição do grânulo obtido após a centrifugação, contendo quantidades iguais da proteína onde foram analisadas pela metodologia SDS-PAGE. Os resultados (ver Fig. 3) mostram a presença de proteínas contaminadas antes do tratamento CPC. Seguindo o tratamenti COC, o grânulo continha a maior parte da proteínas contaminadas, enquanto o flutuante continha uricase em uma única banda maior de proteína.

EXEMPLO 2. Efeito do CPC na Purificação da Única Cadeia (scFv) de Anti-corpos

2.1.1. Isolantes

2.1.1.1. Inclusão do isolante na dissolução do corpo

5 A dissolução do isolante contendo 6 M de uréia, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, e 0.1 M de cisteína. O pH do isolante foi dosado para 8.5

2.1.1.2. Isolante de desdobramento

10 O isolante de desdobramento contendo 1 M de uréia, 0.25 mM Nac1, 1 mM EDTA, e 0.1 M de cisteína. O pH do isolante foi dosado para 10.0.

2.1.2. Expressão dos Anti-corpos scFv na Bactéria

15 Os anti-corpos ScFv (pI8.9) foram expressados em E. coli transformado com um vetor codificando um scFv tendo cisteína-lisina-alanina-lisina na extremidade carboxila como descrito na Publicação do PCT WO 02/059264, incorporada à presente por referência em sua integridade.

2.1.3. Cultura e Colheita do Anti-corpo scFv Produzindo Bactéria

20 As células bacteriais contendo ScFv foram cultivadas na média mínima, em pH 7.2, e suplementadas com L-arginina, concentração final de 0.5%, durante o período de 5 horas antes da indução. A expressão do scFv foi induzida pela limitação da quantidade da glicose na média. O ScFv contendo células bacteriais foram colhidas da cultura por ultra-filtragem.

2.1.4. Rompimento da Célula e Recuperação dos Corpos de Inclusão

25 O grânulo da célula colhida foi suspensa no isolante 50 mM Tris, pH 8.0 e 10 mM EDTA trazendo um final volume de aproximadamente 20 vezes o peso da célula seca (DCW). O lisossoma, em uma concentração de 2000-3000 unidades por minuto, foi adicionado ao grânulo suspenso enquanto era misturado, e então sendo incubado por 16-20 horas, à 4° C. A célula do lisato foi tratada por alta mistura e subsequente por sonificação. O anti-corpo scFv contendo os corpos de inclusão foram recuperados por centrifugação à 10.000 x g. O grânulo
30 foi diluído aproximadamente dezesseis dobras com água dionizada (w/w) e centrifugado para remover adicionais impurezas. O grânulo obtido desta última etapa de lavagem foi resguardada com adicional processamento.

2.1.5. Dissolução e Desdobramento

O grânulo IB enriquecido foi suspenso no isolante de dissolução do corpo de inclusão (ver acima) incubado por 5 horas em temperatura ambiente, e desdobrada in vitro em uma solução baseada em arginina/glutathione oxidada. Após a desdobra, a proteína foi dializada e concentrada pela filtragem do fluxo tangencial contendo isoante de uréia/fosfato.

2.1.6 Tratamento CPC

10% de solução de CPC foi adicionada à mistura desdobrada scFv para uma concentração final de 0.02%, e após 1-2hr. de incubação, em temperatura ambiente, sendo a precipitação removida por filtragem.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Efeito da Concentração do CPC no Anti-corpo Recuperável scFv

Os efeitos do CPC (em pH 7.5 ou 10) na pureza e recuperação do anti-corpo scFv são apresentados na Tabela 3. Antes do tratamento CPC, a quantidade inicial da proteína IB foi de 73 mg, contendo 15.87 mg do anti-corpo scFv como determinado pela análise HPLC em Superdex 75. O tempo de retenção (RT) dos picos contendo o anti-corpo scFv foi de aproximadamente 20.6 minutos. Os resultados indicam que a recuperação da proteína total geralmente diminuiu com o acréscimo da concentração do CPC, e a recuperação do anti-corpo scFv permaneceu >80% quando a concentração foi <0.03%. A mais eficiente remoção da proteína contaminada foi alcançada em pH 7.5 relativo àquele no pH 10. Assim a purificação do anti-corpo scFv foi alcançada pelo tratamento com 0.01 à 0.03% do CPC.

Tabela 3. Efeito do Tratamento CPC na Recuperação e Pureza do Anti-Corpo scFv

Tratamento do IBs solúvel	Proteína Total (mg)	Total do scFv pelo HPLC (mg)	Fator de Purificação	% de Recuperação do scFv pelo HPLC
Controle (Antes do CPC)	73	15.87		100
0.01% do CPC (pH 7.5)	64	15.66	1.13	98.68

0.015 do CPC (pH 10)	50.76	14.97	1.36	94.33
0.015% do CPC (pH 7.5)	54	14.49	1.23	91.30
0.02% do CPC (pH 10)	39.96	14.22	1.64	89.60
0.02% do CPC (pH 7.5)	43	13.35	1.43	84.12
0.02% do CPC (pH 7.5)	37.8	13.02	1.58	82.04
0.03% do CPC (pH 10)	35	11.12	1.46	70.07
0.03% do CPC (pH 7.5)	37.8	12.47	1.52	78.58

2.3 CONFIRMAÇÃO DA INTENSIFICAÇÃO DO CPC DA PUREZA DO ANTI-CORPO scFv

2.3.1. Análise do HPLC da Recuperação do scFv Seguindo Tratamento Com CPC

- 5 A análise HPLC da proteína desdobrada indica que o anti-corpo scFv associado com o pico (tempo de retenção (RT) ~ 20.6 minutos) compreendido aproximadamente em 22.7% da proteína da total proteína (Fig. 4B). O cromatograma da Fig. 4C indica que o seguinte tratamento com 0.02% do CPC. O anti-corpo scFv ao pico associado do flutuante compreendido em
- 10 aproximadamente 75.9% do total da proteína injetada, uma purificação 3.3-desdobrada. Desta forma, o tratamento CPC removeu as impurezas da proteína das soluções do anti-corpo scFv.

2.3.2. Análise do SDS-PAGE na Recuperação dp scFv Seguindo o Tratamento CPC

- 15 Os resultados (ver Figura 5) indicam que antes ao tratamento CPC, o grânulo continha um grande número de proteínas. Em contraste, o pós tratamento CPC do flutuante continha uma maior banda de proteína do que o do anti-corpo scGv;

EXEMPLO 3. Efeito do CPC na Purificação do Beta-Interferon Recombinador

O Beta interferon (Beta-IFN, pl 8.5-8.9) foi expressado em métodos E. coli conhecidos. Nagola, S. et al., Nature, 284:316 (1980); Goeddel, D.V. et al., Nature, 287:411 (1980); Yelverton, E. Et al., Nuc. Acid. Res., 9:731 (1981); Streuli, M. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (U.S.); 78:2848 (1981); Pedidos de Patente Europeus No. 28033 publicado em 6 de maio de 1981; No. 34307 publicado em 26 de agosto de 1981, e Patente Belga No. 837397, expedida em 1 de julho de 1981 descreveram vários métodos para a produção do beta-interferon empregando técnicas de DNA recombinadoras. Os procedimentos para a recuperação e purificação bacteriana produziram IFNs como descritos nas Patentes Norte-Americanas Nos. 4.450.104; 4.315.852; 4.343.735; e 4.343.736; e Derynck et al., Nature (1980) 287: 193-197 e Scandella e Kornberg, Biochemistry, 10: 4447 (1971). Corpos de inclusão contendo beta-IFN foram isolados e solubilizados. A solução resultante foi tratada com CPC. Os resultados mostrados na Figura 6, indicam um substancial decréscimo no nível das proteínas contaminantes apresentadas após o tratamento CPC. A quantidade atual do beta-IFN (área sob pico) não foi alterada consideravelmente seguindo o tratamento CPC. A Tabela 4 sumariza os efeitos do tratamento CPC. A proteína total (Bradford) decresceu até 40%, a absorção UV decresceu em aproximadamente 40%, mas a quantidade de beta-IFN permaneceu inalterada.

TABELA 4.

Amostra e Tratamento	Proteína (mg/ml)	O. D A_{280}	Conteúdo IFNb (mg/ml) ^a	Perfil SEC
Controle (desdobramento da proteína pós tratamento no CPC, 1049-31)	0.51	1.55	0.069	Pico de R.T 13 ^b min. Sendo 15% da área total
Teste (desdobramento da proteína pós tratamento com	0.3	1.0	0.069	Pico de R.T 13 ^b min. Sendo 7.34% da área total

42

0.05% de CPC, 1049-31)				
---------------------------	--	--	--	--

^a Quantificado pela coluna Vydac C4

^b O perfil contido em vários picos. O pico iluindo em 13 minutos (R.T. 13 min.) sendo reduzido no tratamento com CPC e que corresponde à região onde as proteínas de alto peso molecular e as variantes das mesma eluim;

5 **EXEMPLO 4. Efeito do CPC na Purificação do fator Inibidor Xa**

O CPC foi usado para purificar o inibidor parasita fator Xa. O inibidor parasita fator Xa (FxaI, pl 8.4-9.1) poderá ser produzido como descrito na Patente Norte-Americana No. 6.211.341 e na Publicação da Patente Internacional No. WO04/23735. Seguindo o o isolamento dos corpos de inclusão contendo FX-al (IBs). O FxaI foi purificado do IBs substancialmente como descrito no Exemplo 1. Após a dissolução do grânulo IB, a preparação foi incubada com 10% da solução CPC. Assim, a mistura foi centrifugada por 15 minutos, em 12.000 x g. O grânulo e o flutuante foram separados. O grânulo foi suspenso com o isolante 50 mM NaHCO₃ ao volume original. O grânulo e o flutuante foram separadamente concentrados e dailizados para remover o permanecente CPC. O conteúdo da proteína e a atividade foram analisadas e o FxaI foi encontrado para ser o predominante componente no flutuante e substancialmente ausente no grânulo. Os resultados indicam que o tratamento CPC ressaltou a eficiência da recuperação e pureza do recuperado FxaI.

20 **EXEMPLO 5. Purificação da Carboxipeptidase B (CPC) pelo CPC**

Idênticas quantidades dos corpos de inclusão obtidas de um clone expressando CPB foram solubilizadas em 8 M de uréia, pH 9.5 (controle e teste). A produção do CPB é descrita na Publicação da Patente Internacional No. WO/096/23064 e na Patente Norte-Americana No. 5.948.668. A amostra teste foi tratada com 0.11% de CPC e purificada por filtragem antes do desdobramento. O desdobramento do controle das amostras do teste foram realizados pela diluição das soluções 1:8 no isolante desdobrado. Após o tratamento com endoproteinase durante toda a noite em temperatura ambiente, iguala as quantidades do controle e soluções dos testes onde foram carregados com uma coluna DEAE Sefarose. A coluna foi lavada e a enzima ativa foi

subseqüentemente eluída com 60 mM de Cloreto de Sódio em um isolante 20 mM Tris pH8.

TABELA 5.

Etapa de Processo	Parâmetro	Tratamento	
Dissolução e, 8 M de Uréia Pós Purificação	Total A ₂₈₀	Controle 960	0.11% de CPC 494
	Conteúdo da Proteína (mg)*	490	272
	PH	490	272
	Atividade da Enzima (Unidades)	9.5 Inativo (**)	9.5 Inativo (**_
Cromatografia de 26.5mg da Desdobrada (DEAE MP)	Conteúdo da Proteína (mg)*	5.67	8.41
	Atividade da Enzima (Unidades)	258	4043
	Atividade Específica (Unidades/mg)	98	481

(*) A determinação da proteína foi realizada pelo método Bradford.

(**) Antes do desdobramento a proteína era inativa.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram o total OD em pequena quantidade do material tratado por 49.5% do conteúdo total da proteína que foi reduzido até 45%. Interessantemente, o total da atividade da enzima recuperada na amostra tratada com CPC aumentou até 79% , sugerindo que o CPC removeu um componente que parcialmente inibiu a geração da enzima ativa.

Todas as referências aqui citadas por referência em sua integralidade e para todos os propósitos da mesma extensão para todas as publicações, pedidos de patente e patentes citadas foram especificamente e individualmente indicados para serem incorporados à presente invenção por referência. Muitas



modificações e variações da presente invenção poderão ser feitas sem fugir do espírito e escopo da presente invenção, que poderão ser aparentes perante o estado da técnica. As específicas incorporações descritas aqui são oferecida a título exemplificativo, a a invenção fica restrita aos termos das reivindicações apresentadas a seguir.

5

REIVINDICAÇÕES

1. **"MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA ALVO"**, caracterizado por compreender a identificação de uma proteína alvo e contatando uma solução compreendendo a proteína alvo solubilizada e uma ou mais proteínas contaminadas solubilizadas com um ou mais surfactantes catiônicos em uma quantidade efetiva para seletivamente precipitar a uma ou mais proteínas contaminadas.

2. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ainda compreender a etapa de recuperação da proteína alvo solubilizada.

3. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ao menos um ou mais surfactantes catiônicos serem um composto de amônia anfipática.

4. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o composto de amônia anfipática ser selecionado a partir de um grupo consistindo de compostos de amônia quaternária de fórmula geral QN^+ ; compostos de amônia primária parafina da fórmula geral RNH_3^+ ; e sais dos mesmos.

5. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o composto de amônia anfipática ser selecionado a partir de um grupo consistindo de sais piridínicos cetila, sais metilpiridínicos estearamida, sais piridínicos lauril, sais quinolínicos cetila, sais de éster de ácido de metila aminopropiônico lauril, sais metálicos de ácido propiônico amino lauril, betaína dimetila lauril, betaína dimetila estearílico, betaína dihidroxietil lauril e sais benzetônios

6. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o composto de amônia anfipática ser selecionado de um grupo a partir de cloreto de hexadecilpiridina, acetato de dequalínio, cloreto de hexadecilpiridínio, cloreto de cetiltrimelamônia, cloreto de benzilamônia dimetila n-alcil misturado, cloreto de cetilapridina, N,N-dimetila-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3,-tetrametilbutila)-fenoxil]etoxil]etil cloreto 80

de benzenematanamônia, cloreto de amônia alcil-dimetilabenzila, cloreto dicloro-benzildimetil-alcilamônia, brometo trimetilamônia tetradecila, brometo trimetilamônia dodecila, brometo trimetilamônia cetila, betaína dimetila lauril, betaína dimetila estearílico e betaína dihidroxietila lauril.

7. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o composto de amônia anfipática ser um sal cetilpiridínio.

8. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o sal piridínio ser um sal haleto.

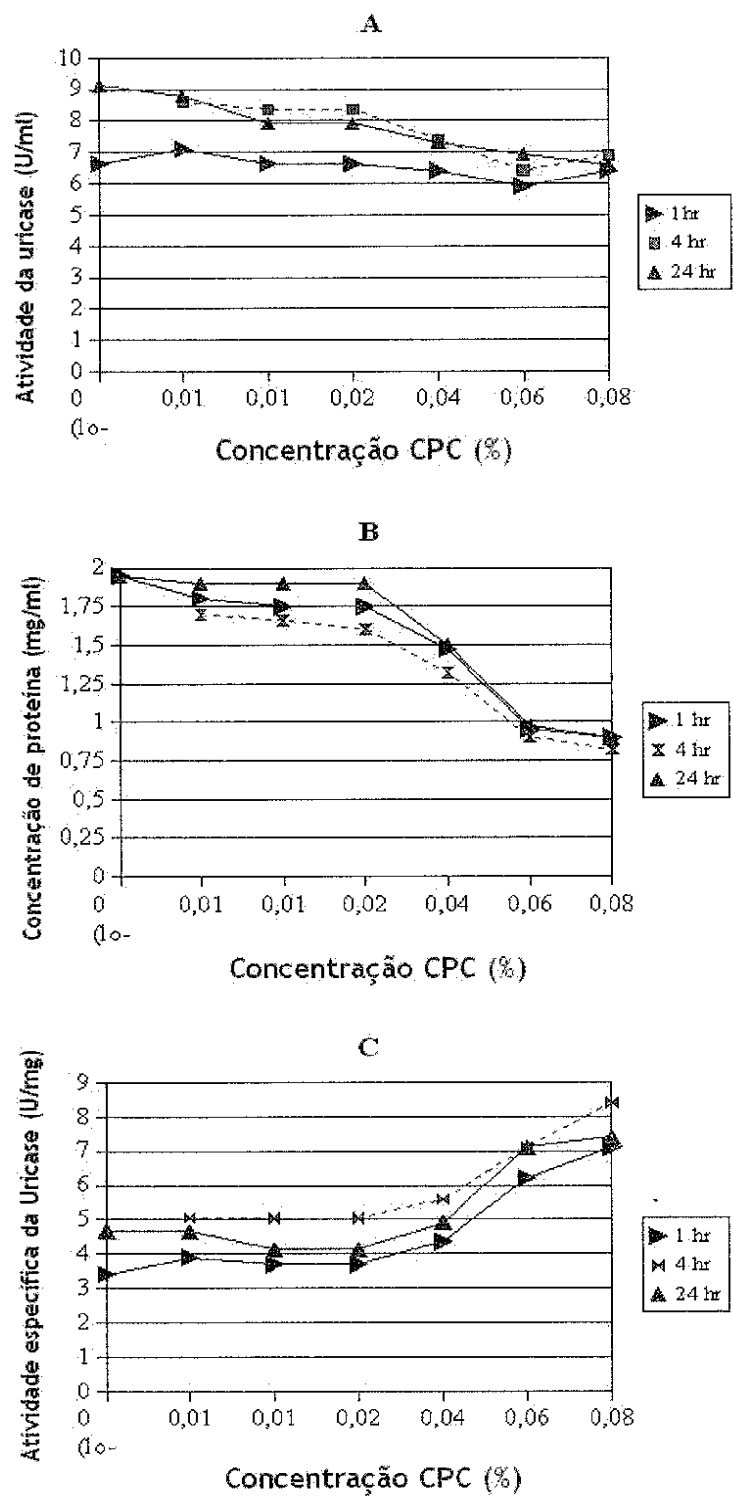
9. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o sal haleto piridinal cetila ser cloreto de cetilapiridínio.
10. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o composto de amônia anfipática ter ao menos uma cadeia alifática tendo 6-20 átomos carbonos.
- 5 11. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a cadeia anfipática ter 8-18 átomos carbonos.
12. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução ainda compreender um ou mais componentes celulares.
13. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por um ou mais
10 componentes celulares serem derivados de um micro-organismo.
14. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o micro-organismo ser uma bactéria.
15. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a bactéria ser E. coli.
- 15 16. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por um ou mais componentes celulares serem uma ou mais proteínas.
17. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína alvo ser uma proteína re-combinável.
18. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por a proteína re-
20 combinável ser uma enzima.
19. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por a proteína alvo ser selecionada a partir de um grupo consistindo de um anti-corpo, uma uricase, um beta-interferon, um fator inibidor X, um ácido deoxiribunuclease II, uma elastase, um lisossoma, uma papaína, uma peroxidase, uma
25 ribonuclease pancreática, um tripsinogênio, uma tripsina, um citocromo c, uma erabutoxina, estafilococo áureo enterotoxina C1, um interferon e um oxidase mono-amina A.
20. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína alvo ser uma uricase.
- 30 21. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por a uricase ser uma uricase mamífera.
22. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por a uricase ser uma uricase suína.



23. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por a proteína alvo ser um anti-corpo.
24. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o anti-corpo ser uma única cadeia anti-corpo.
- 5 25. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por a proteína alvo ser um interferon.
26. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada por o interferon ser um beta interferon.
27. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por um ou mais
10 surfactantes catiônicos serem adicionados em uma concentração de 0.001% à 5.0%.
28. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por um ou mais surfactantes catiônicos serem adicionados em uma concentração de 0.01% à 0.5%.
29. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por um ou mais surfactantes catiônicos serem adicionados em uma concentração de 0.03% à 0.2%.
- 15 30. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o contato ser feito de 5 minutos à 48 horas.
31. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o contato ser feito de 10 minutos à 24 horas.
32. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o contato ser feito
20 à uma temperatura de 4° C à 36° C.
33. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o contato ser feito à uma temperatura de 4° C à 26° C.
34. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução ser substancialmente livre de poliânions.
- 25 35. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução ser substancialmente livre de suportes sólidos.
36. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução ser substancialmente livre de agregados de proteínas contaminadas com outras moléculas.
37. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a
30 solução ser substancialmente livre de poliânions, suportes sólidos e agregados de proteínas contaminadas com outras moléculas.
38. **"MÉTODO"**, de acordo com as reivindicações 35, 36 ou 37, caracterizado por o surfactante catiônico ser um sal cetilapiridínio.

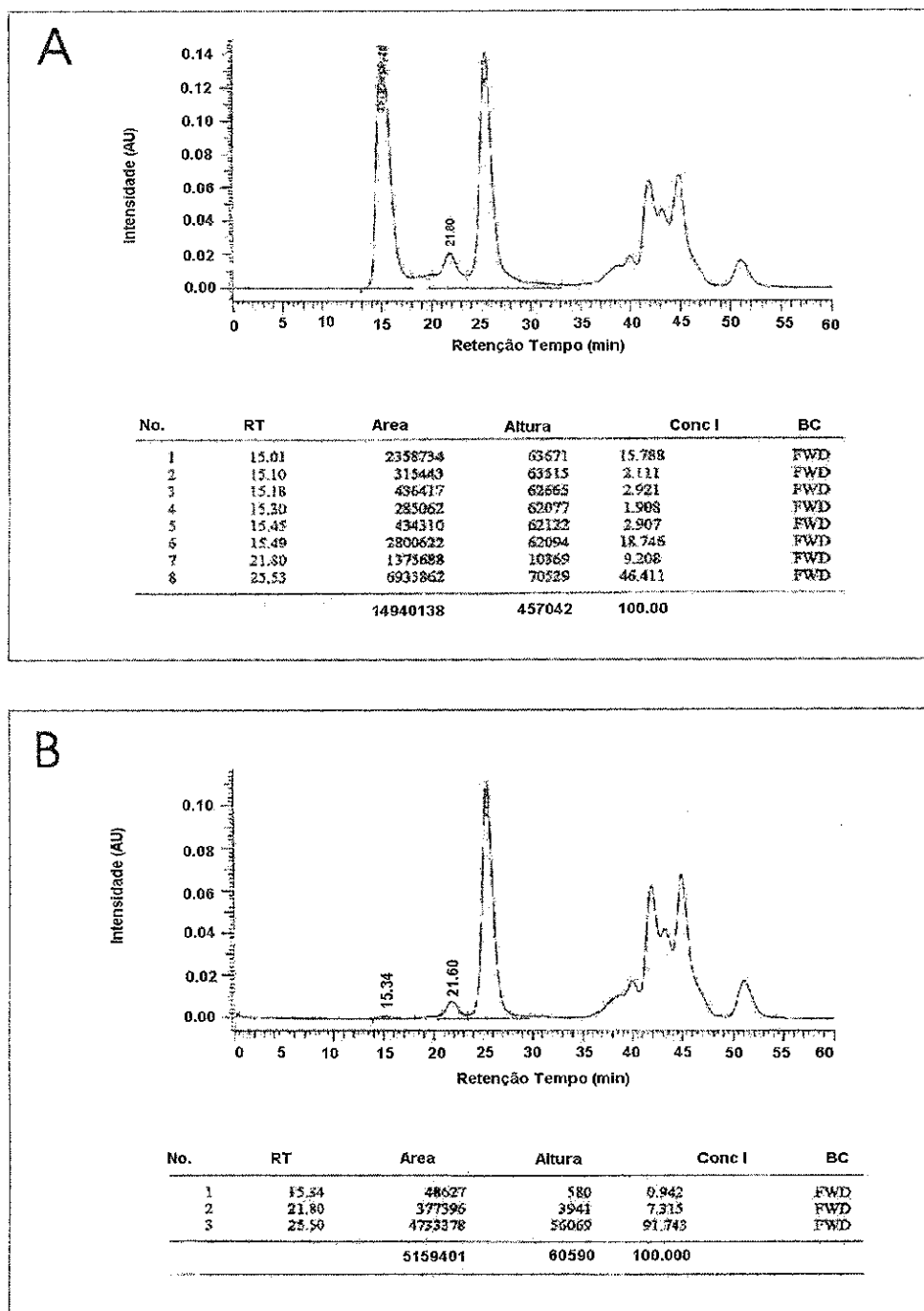
39. **"MÉTODO"**, de acordo com as reivindicações 37, 38 ou 39, caracterizado por o sal cetilapiridínio ser um cloreto de cetilapiridínio.
40. **"MÉTODO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína alvo ter um ponto isoelétrico maior ou igual à 7.
- 5 41. **"PROTEÍNA PURIFICADA"**, caracterizada por ser preparada de acordo com o método da reivindicação 1.
42. **"URICASE PURIFICADA"**, caracterizada por ser preparada de acordo com o método da reivindicação 1.
43. **"URICASE PURIFICADA"**, de acordo com a reivindicação 42, caracterizada por a uricase ser um uricase mamífera.
- 10 44. **"URICASE PURIFICADA"**, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada por a uricase mamífera ser uma uricase suína.
45. **"URICASE PURIFICADA"**, de acordo com a reivindicação 42, caracterizada por a uricase ser de uma célula de bactéria onde a célula bacteriana compreende DNA codificando a uricase e o DNA sendo expressado para produzir a uricase.
- 15 46. **"URICASE PURIFICADA"**, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada por a uricase ser recuperada a partir da inclusão de corpos produzidos pela célula bacteriana.
47. **"MÉTODO PARA PURIFICAR UMA PROTEÍNA ALVO"**, caracterizado por compreender as etapas de:
- 20 a. identificação de uma proteína alvo;
- b. contato com a solução compreendendo proteína alvo solubilizada e um ou mais proteínas contaminadas com um ou mais surfactantes catiônicos em uma quantidade efetiva para seletivamente precipitar a uma ou mais proteínas contaminadas; e
- c. recuperação da proteína alvo solúvel.
- 25 48. **"MÉTODO PARA AUMENTAR A PERCENTAGEM DE UMA PROTEÍNA ALVO EM UMA SOLUÇÃO DE PROTEÍNAS"**, caracterizado por compreender as etapas de:
- a. obtenção de uma solução de uma pluralidade de proteínas, onde as proteínas em solução compreendem a proteína alvo e proteínas contaminadas, e a proteína alvo compreender uma primeira percentagem por peso da proteína total na solução ;
- 30 b. contato com a solução com um ou mais surfactantes catiônicos em uma quantidade efetiva para seletivamente precipitar as proteínas contaminadas, onde a

proteína alvo na solução da etapa b compreende uma segunda percentagem por peso da proteína total, e a segunda percentagem sendo maior do que a primeira percentagem.

Figura 1

51

Figura 2



5f

Figura 3

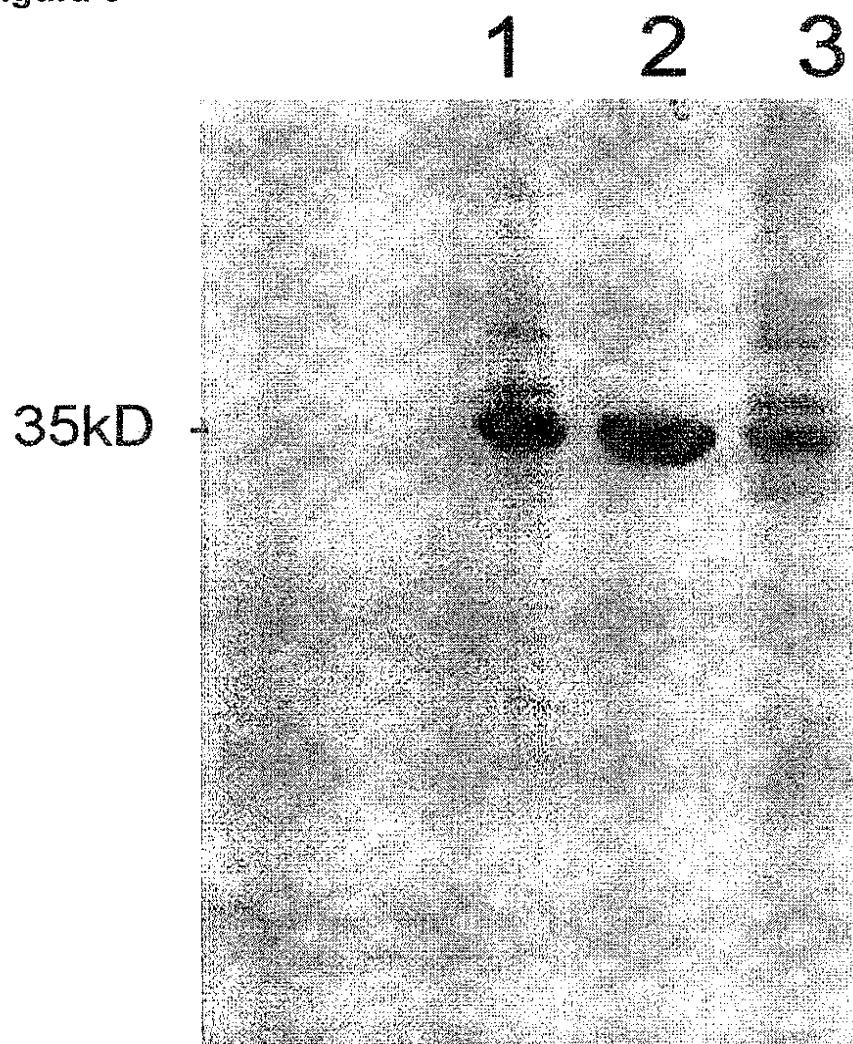
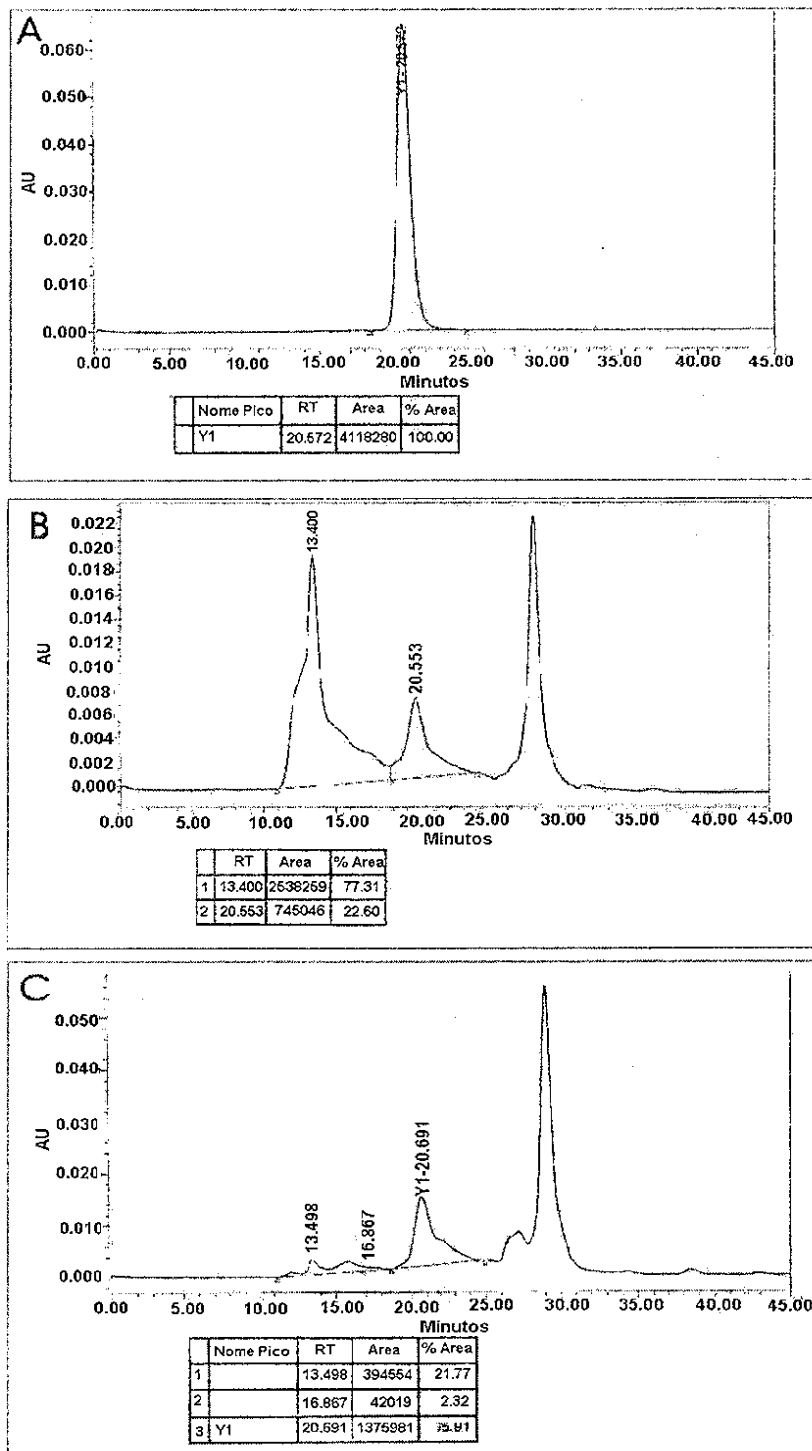


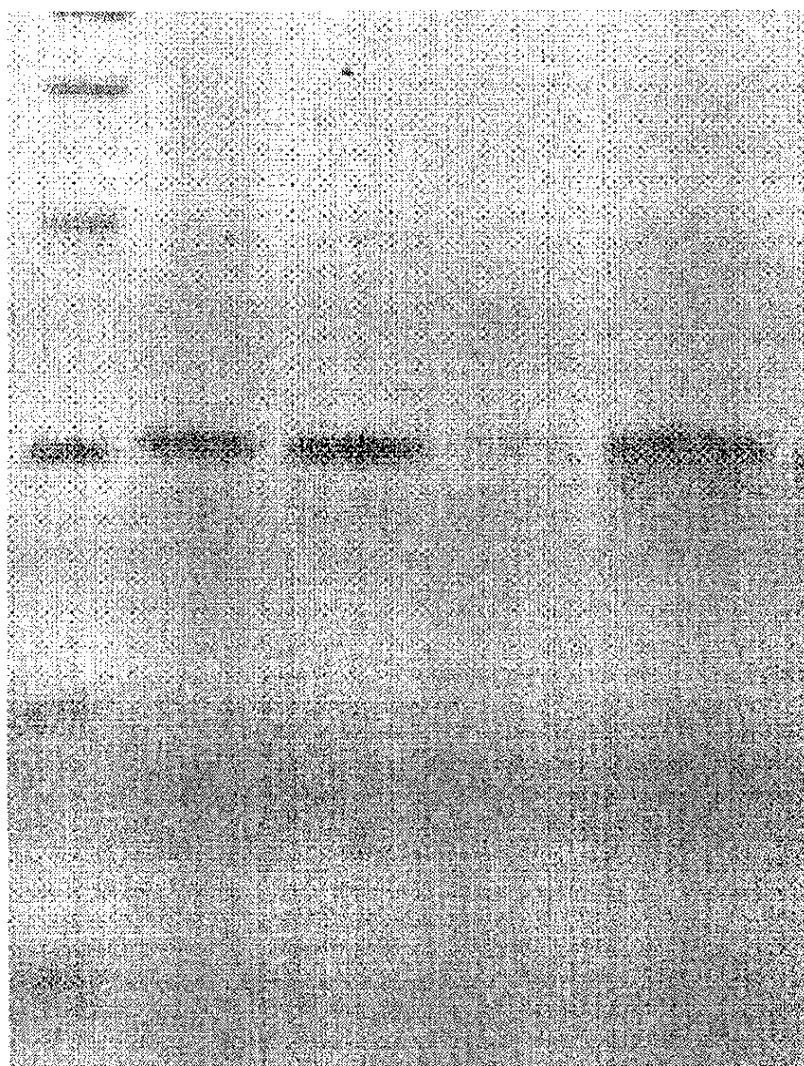
Figura 4



54

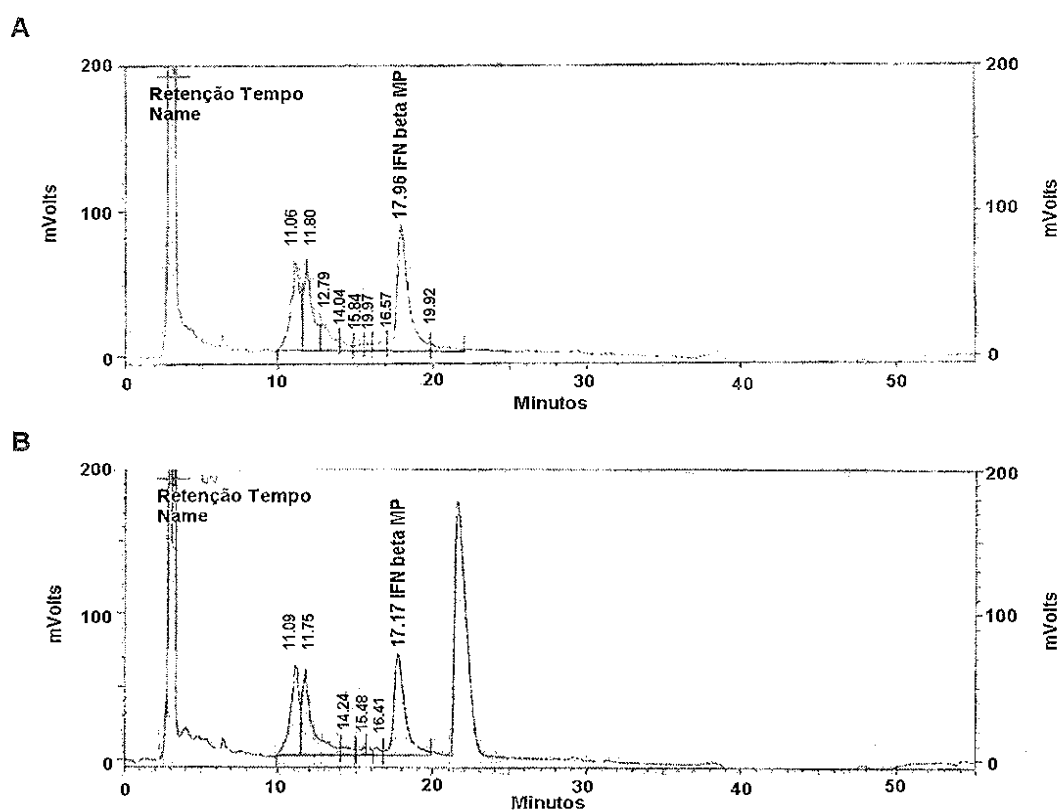
Figura 5

1 2 3 4 5



55
8

Figura 6



RESUMO**“PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SURFACTANTE CATIÔNICO”**

- 5 A presente invenção provê um método para a purificação de uma proteína alvo de uma mistura compreendendo a proteína alvo e a proteína contaminada, compreendendo as etapas de exposição da mistura à uma efetiva quantidade de um surfactante catiônico de modo que a proteína contaminada seja preferencialmente precipitada e dessa forma recuperando a proteína alvo. As proteínas purificadas, de acordo com o método da presente invenção são também providas.