



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 862 580**

⑮ Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/32 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2010 PCT/US2010/039854**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10151688**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10729997 (6)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **13.12.2023 EP 2445924**

⑤ Título: **Procesos de purificación por captura para proteínas expresadas en un sistema no de mamífero**

⑩ Prioridad:

25.06.2009 US 220477 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
13.06.2024

⑦ Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

⑧ Inventor/es:

**SHULTZ, JOSEPH, EDWARD y
HART, ROGER**

⑨ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Procesos de purificación por captura para proteínas expresadas en un sistema no de mamífero

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a procesos para purificar proteínas expresadas en sistemas no de mamífero en formas insolubles no nativas, y más particularmente a la captura directa de tales proteínas desde una mezcla de replegamiento o un conjunto de lisado celular mediante una matriz de separación.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteínas que contienen Fc se expresan normalmente en células de mamífero, tales como células CHO. El uso de cromatografía de afinidad para purificar proteínas que contienen Fc está documentado (véase, por ejemplo, Shukla *et al.*, (2007) *Journal of Chromatography B* 848(1):28-39) y es exitoso, en parte, debido al grado de estructura Fc observada en proteínas expresadas en tales sistemas. Sin embargo, las proteínas que contienen Fc expresadas en células no de mamífero se depositan a menudo en las células de expresión en formas de solubilidad limitada, tales como cuerpos de inclusión, que requieren replegamiento, y esto ha sido un factor limitante en la selección de sistemas no de mamífero para expresar proteínas que contienen Fc.

20

Un inconveniente del uso de proteína A, proteína G y otras entidades químicas es que con el fin de que una proteína que comprende una región Fc se asocie con la molécula de proteína A o proteína G, es necesario que la proteína tenga una cantidad mínima de estructura. A menudo, la cantidad requerida de estructura está ausente en proteínas expresadas de manera recombinante en una forma soluble, pero no nativa, y en consecuencia la cromatografía de proteína A no se realiza en un proceso de purificación.

30 En el caso de una proteína expresada en una forma no nativa insoluble, la cromatografía de proteína A normalmente no se realiza en un proceso de purificación hasta después de que la proteína se haya replegado hasta un grado en el que pueda asociarse con la molécula de proteína A y se haya diluido posteriormente fuera de su disolución de replegamiento. Esto se debe a que se creía que después de haber replegado una proteína era necesario diluir o eliminar los componentes de la mezcla de replegamiento en una etapa de lavado, debido a la tendencia de los componentes que constituyen normalmente una disolución de replegamiento a alterar las interacciones entre la proteína diana y las moléculas de proteína A (Wang *et al.*, (1997). *Biochem. J.* 325(Part 3):707-710). Esta etapa de dilución puede consumir tiempo y recursos que, cuando se trabaja a una escala de fabricación de miles de litros de cultivo, pueden ser costosos.

35 El documento DE 10 2005 033 250 A1 se refiere a un método para obtener factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante, que comprende al menos una cromatografía de intercambio catiónico y al menos una cromatografía de interacción hidrófoba, en el que dichas dos etapas cromatográficas son inmediatamente consecutivas en un orden opcional.

40 ARVIDSSON, P., *ET AL.*: "Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent", *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, vol. 986, n.º 2, 7 de febrero de 2003, páginas 275-290, da a conocer una matriz macroporosa continua que permite la captura directa de enzimas desde un homogeneizado celular bruto no clarificado. La columna contiene una matriz continua que tienen poros interconectados de 10-100 µm de tamaño. Ácido iminodiacético acoplado covalentemente a la matriz es una posibilidad para purificaciones cromatográficas de afinidad de metal inmovilizado de lactato deshidrogenasa etiquetada con His recombinante, originada a partir de bacteria termófila, *Bacillus stearothermophilus*, pero expresada en *Escherichia coli*.

45 50 LING, *ET AL.*: "Integration of mechanical cell disruption and fluidised bed recovery of G3PDH from unclarified disrupted yeast: A comparative study of the performance of unshielded and polymer shielded dye-ligand chromatography systems", *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, vol. 119, n.º 4, 10 de octubre de 2005, páginas 436-448, se refiere a un proceso para la alteración y la purificación selectiva directa simultáneas de proteínas intracelulares de disruptado de levadura no clarificado. Se seleccionó la recuperación de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) a partir de levadura de panadería. La aplicación de un adsorbente caracterizado por una alta densidad facilitó la combinación de la operación de disruptión celular con adsorción ligada a colorante en lecho fluidizado realizado inmediatamente aguas abajo del disruptor.

55 60 El documento US 5.466.377 A da a conocer un método y partículas de cromatografía de perlas grandes para la captura directa de un producto deseado a partir de un licor de proceso no clarificado en columnas de cromatografía de lecho empaquetado, de baja presión, estándar. Las perlas son suficientemente grandes, de modo que los contaminantes particulados pueden fluir en la luz entre partículas y salir de la columna sin obstruir el flujo. El producto deseado se captura simultáneamente mediante los grupos funcionales de las perlas.

65

FISCHER, ET AL.: "Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 41, n.º 1, 5 de enero de 1993, páginas 3-13, es una revisión que presenta varios métodos desarrollados para aislar polipéptidos eucariotas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión, y para generar enlaces disulfuro nativos, para obtener proteínas activas.

5 El artículo resume las diferentes etapas y métodos de aislamiento y renaturalización de proteínas eucariotas que contienen enlaces disulfuro, que se han expresado en *E. coli* como cuerpos de inclusión, y muestra que métodos desarrollados originalmente para estudiar el mecanismo de plegamiento de proteínas que se producen de manera natural se han adaptado exitosamente para la reactivación de proteínas eucariotas recombinantes.

10 RÖNNMARK J ET AL: "Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 261, n.º 1-2, 1 de marzo de 2002, páginas 199-211, es un artículo científico sobre la construcción y caracterización de quimeras de aficuerpo-Fc producidas en *Escherichia coli*. Las proteínas de fusión de aficuerpo-Fc se expresaron en *E. coli*. En la recolección, las células se sometieron a choque osmótico y se recogió la fracción periplásrica. Posteriormente, las proteínas de fusión de aficuerpo-Fc se purificaron 15 mediante cromatografía de afinidad usando un medio de flujo rápido de proteína A recombinante cargándolas en la columna, lavando la columna y eluyéndolas de la columna. La presente divulgación aborda estas cuestiones proporcionando métodos simplificados de purificación de proteínas que comprenden regiones Fc que se expresan en sistemas de expresión no de mamífero en una forma soluble no nativa o en una forma insoluble no nativa.

20 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporciona un método de purificación de una proteína expresada en una forma soluble no nativa en un sistema de expresión no de mamífero. La solicitud da a conocer un método no reivindicado que comprende (a) lisar una 25 célula no de mamífero en la que la proteína se expresa en una forma soluble no nativa para generar un lisado celular; (b) poner en contacto el lisado celular con una matriz de separación en condiciones adecuadas para que la proteína se asocie con la matriz de separación; (c) lavar la matriz de separación; y (d) eluir la proteína de la matriz de separación.

30 La proteína puede ser una proteína compleja, tal como una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína multimérica, un anticuerpo y una proteína de fusión Fc. El sistema de expresión no de mamífero puede comprender células bacterianas o de levadura. La matriz de separación puede ser una resina de afinidad, tal como una resina de afinidad seleccionada del grupo que consiste en proteína A, proteína G y una resina de afinidad mimética sintética, o puede ser una resina no de afinidad, tal como una resina no de afinidad seleccionada del grupo que consiste en una resina de intercambio iónico, de modo mixto y de interacción hidrófoba. El lisado celular puede 35 filtrarse antes de ponerse en contacto con la matriz de separación. Aunque no se requiere, el método puede comprender además replegar la proteína a su forma nativa después de eluirse de la matriz de separación.

40 Se proporciona un método de purificación de una proteína expresada en una forma de solubilidad limitada no nativa en un sistema de expresión no de mamífero. En una realización, este método, tal como se define en la reivindicación 1, comprende (a) expresar una proteína en una forma de solubilidad limitada no nativa en una célula no de mamífero; (b) lisar una célula no de mamífero; (c) solubilizar la proteína expresada en una disolución de solubilización que comprende uno o más de los siguientes: (i) un desnaturalizante y (ii) un reductor; (d) formar una disolución de replegamiento que comprende la disolución de solubilización y un tampón de replegamiento, comprendiendo el tampón de replegamiento uno o más de los siguientes: (i) un desnaturalizante; (ii) un supresor de la agregación; (iii) un estabilizador de proteína; y (iv) un componente redox; (e) aplicar la disolución de replegamiento a una matriz de separación en condiciones adecuadas para que la proteína se asocie con la matriz; (f) lavar la matriz de separación; y (g) eluir la proteína de la matriz de separación, en el que la matriz de separación es una resina de afinidad seleccionada del grupo que consiste en resina de proteína A, de proteína G y de afinidad mimética sintética, y en el que la forma de solubilidad limitada no nativa es una forma en la que la proteína carece de 45 al menos una característica estructural formada encontrada en una forma de la proteína que (a) es biológicamente activa en un ensayo *in vivo* o *in vitro* apropiado diseñado para evaluar la actividad biológica de la proteína y/o (b) forma agregados que requieren tratamiento para volverse solubles, en el que tras la etapa (g) no se lleva a cabo ninguna otra etapa de purificación.

55 La forma de solubilidad limitada no nativa puede ser un componente de un cuerpo de inclusión. La proteína puede ser una proteína compleja, tal como una proteína compleja seleccionada del grupo que consiste en una proteína multimérica, un anticuerpo, un pepticuerpo y una proteína de fusión Fc. El sistema de expresión no de mamífero puede ser células bacterianas o de levadura. El desnaturalizante puede comprender una o más de urea, sales de guanidinio, dimetilurea, metilurea y etilurea, el reductor puede comprender uno o más de cisteína, DTT, beta-60 mercaptoetanol y glutatión, el supresor de la agregación puede seleccionarse del grupo que consiste en arginina, prolina, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos, el estabilizador de proteína puede comprender uno o más de arginina, prolina, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos, y el componente redox puede comprender uno o más de glutatión reducido, glutatión oxidado, cisteína, cistina, cisteamina, cistamina y beta-mercaptopropano. La matriz de separación puede ser una resina de afinidad tal como una 65

resina de afinidad seleccionada del grupo que consiste en resina de proteína A, de proteína G y de afinidad mimética sintética, o la matriz de separación puede ser una resina no de afinidad seleccionada del grupo que consiste en una resina de intercambio iónico, modo mixto y de interacción hidrófoba.

- 5 En otras realizaciones, los métodos dados a conocer pueden comprender además las etapas de (h) lavar la matriz de separación con un reactivo de regeneración; y (i) regenerar la matriz de separación. El reactivo de regeneración puede ser uno de una base fuerte, tal como hidróxido de sodio, o un ácido fuerte, tal como ácido fosfórico. La regeneración puede comprender lavar la matriz de separación con una disolución que comprende uno o ambos de un caótropo presente a una concentración de 4-6 M y un reductor. El caótropo puede ser uno de urea, dimetilurea, 10 metilurea, etilurea y guanidinio, y el reductor puede ser uno de cisteína, DTT, beta-mercaptopetanol y glutatión. En una realización particular, la regeneración comprende lavar la matriz de separación con una disolución que comprende Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M, DTT 50 mM a pH 7,4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La Figura 1 es una representación gráfica que demuestra la unión de proteína compleja de fracción de solubilidad limitada no nativa no de mamífero, replegada, a medios de proteína A; en la figura la X indica carga de resina a un tiempo de residencia de 9,32 min, la estrella indica carga de resina a un tiempo de residencia de 7,68 min y los círculos llenos indican carga de resina a un tiempo de residencia de 6 min.

20 La Figura 2 es una tabla que demuestra la purificación de una proteína compleja que comprende un dominio Fc usando resina de proteína A.

25 La Figura 3 es una tabla que demuestra la capacidad de reutilización de resina de proteína A cuando se usa para capturar una proteína compleja de solubilidad limitada no nativa no de mamífero a lo largo de 150 ciclos usando los métodos dados a conocer.

30 La Figura 4 es una representación gráfica que demuestra los perfiles de unión de una proteína compleja de solubilidad limitada no nativa no de mamífero, replegada con respecto a seis resinas de intercambio iónico diferentes (resinas IEX 1, 2, 3, 4, 5, 6, correspondientes a Toyopearl SP550C™, Toyopearl SP650M™, GigaCAPS™, POROS HS50™, Toyopearl SP650C™ y GE Healthcare SPxL™, respectivamente) y una resina de modo mixto (resina MMC 1, GE Healthcare MMC™) tras la captura usando los métodos dados a conocer.

35 La Figura 5 es una tabla que demuestra los niveles de purificación conseguidos para una proteína que comprende un dominio Fc usando una resina de intercambio aniónico (Fractogel TMAE™) y una resina de intercambio catiónico (Fractogel SO₃™).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

40 La presente divulgación proporciona métodos de captura sobre una matriz de separación de proteínas no nativas producidas en células microbianas. En el caso de la captura directa de una proteína expresada en una forma soluble no nativa, las ventajas con respecto a los procesos típicos incluyen una concentración de proteína potenciada, una reducción del volumen y una recuperación aumentada con respecto a los métodos tradicionales, una estabilidad de proteína mejorada y en última instancia ahorros de costes de proceso.

45 En el caso de la captura directa de una proteína expresada en una forma de solubilidad limitada no nativa, las ventajas de la presente invención con respecto a los procesos típicos incluyen la eliminación de la necesidad de diluir la proteína fuera de una disolución de replegamiento antes de capturarla sobre una matriz de separación.

50 Otra ventaja de los métodos dados a conocer es que pueden realizarse a un rango de escalas, desde escala de laboratorio (normalmente escala de mililitro o litros), una escala de planta piloto (normalmente cientos de litros) o a una escala industrial (normalmente miles de litros). La aplicación de los métodos dados a conocer a escalas grandes puede ser particularmente deseable, debido a los ahorros potenciales en tiempo y recursos.

55 Las células no de mamífero, por ejemplo, microbianas, pueden producir de manera natural, o pueden modificarse mediante ingeniería para producir, proteínas que se expresan en una forma o bien soluble o bien de solubilidad limitada. En la mayoría de los casos, las células no de mamífero modificadas mediante ingeniería depositarán las proteínas recombinantes en grandes agregados de solubilidad limitada denominados cuerpos de inclusión. Sin embargo, ciertas condiciones de crecimiento celular (por ejemplo, temperatura o pH) pueden modificarse para hacer

60 que las proteínas recombinantes se expresen como monómeros solubles, intracelulares. Como alternativa a producir una proteína de interés en células en las que la proteína se expresa en forma de cuerpos de inclusión de solubilidad limitada, las condiciones de crecimiento celular pueden modificarse de modo que las proteínas se expresen en una forma no nativa pero soluble. Las células pueden entonces lisarse y la proteína puede aislarse capturándola directamente del lisado celular usando cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de modo mixto, tal como se describe en el presente documento. El método puede ser particularmente útil para purificar proteínas que comprenden una región Fc.

La presente divulgación se refiere a un método no reivindicado de aislamiento de una proteína de interés que comprende una región Fc que se expresa en una célula no de mamífero en una forma no nativa, pero soluble, a partir de un conjunto de lisado generado a partir de la célula en la que se expresó la proteína. El método emplea una matriz de separación, tal como proteína A. Un aspecto beneficioso del método dado a conocer es que elimina la necesidad de una etapa de replegamiento antes de aplicar la proteína a la matriz de separación. Es decir, pueden lisarse células no de mamífero que expresan la proteína de interés en una forma soluble no nativa, el lisado aplicarse directamente a la matriz de separación y la proteína eluirse posteriormente de la matriz de separación. Este proceso permite la separación de proteínas de cultivos celulares en conjuntos altamente concentrados que pueden replegarse posteriormente a altas concentraciones y pueden ser beneficiosos cuando se producen grandes cantidades de proteína, particularmente dado que el método es escalable desde la escala de laboratorio, que implica cultivos del orden de varios litros, hasta la escala de producción, que implica cultivos de miles de litros.

Tras el aislamiento mediante la matriz de separación, la proteína de interés puede opcionalmente replegarse posteriormente usando cualquier técnica de la que se conozca o se sospeche que funcione bien para la proteína de interés.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de aislamiento de una proteína de interés que comprende una región Fc que se expresa en una forma de solubilidad limitada no nativa, por ejemplo, en cuerpos de inclusión, que es necesario replegar y aislar de la mezcla de replegamiento. Comúnmente, una disolución de replegamiento contiene un desnaturizante (por ejemplo, urea u otro caótropo, disolvente orgánico o detergente fuerte), un supresor de la agregación (por ejemplo, un detergente suave, arginina o bajas concentraciones de PEG), un estabilizador de proteína (por ejemplo, glicerol, sacarosa u otro osmolito, sales) y/o un componente redox (por ejemplo, cisteína, cistina, cistamina, cisteamina, glutatión). Aunque a menudo son beneficiosos para replegar proteínas, estos componentes pueden inhibir la purificación (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, (1997) *Biochemical Journal* 325 (Part 3):707-710) y es necesario aislar o diluir la proteína de estos componentes para su procesamiento adicional, particularmente antes de aplicar la proteína a una matriz de separación.

En una realización del método dado a conocer, la purificación se consigue aplicando directamente una proteína de interés, que está presente en una mezcla de replegamiento, a una matriz de separación. En este enfoque, tras una etapa de replegamiento toda la mezcla de replegamiento, incluyendo la proteína de interés, se aplica directamente a una matriz de separación, tal como una resina de proteína A o G. La proteína de interés se asocia con la matriz en presencia de los componentes de tampón de replegamiento, las impurezas se eliminan mediante lavado y la proteína se eluye. Dado que el método omite la necesidad de eliminar cualquier componente de la mezcla de replegamiento antes de aplicar la mezcla de replegamiento a una matriz de separación, el método puede tener el efecto de ahorrar etapas, tiempo y recursos que se gastan normalmente para eliminar la proteína de tampones de replegamiento y dilución en procesos de purificación. El método elimina la necesidad de etapas de purificación posteriores.

Los métodos dados a conocer también pueden emplearse para purificar proteínas expresadas en una forma soluble no nativa y una de solubilidad limitada no nativa en un sistema de expresión no de mamífero que se ha derivatizado posteriormente. Por ejemplo, tras la expresión, una proteína que comprende una región Fc puede asociarse con una molécula pequeña, tal como una toxina. Tales conjugados pueden purificarse usando los métodos descritos en el presente documento.

I. Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, los términos "un" y "una" significan uno/una o más a menos que se indique específicamente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sistema de expresión no de mamífero" significa un sistema para expresar proteínas en células derivadas de un organismo distinto de un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, procariotas, incluyendo bacterias tales como *E. coli*, y levadura. A menudo se emplea un sistema de expresión no de mamífero para expresar una proteína recombinante de interés, mientras que en otros casos una proteína de interés es una proteína endógena que se expresa mediante una célula no de mamífero. Para los propósitos de la presente divulgación, independientemente de si una proteína de interés es endógena o recombinante, si la proteína se expresa en una célula no de mamífero entonces esa célula es un "sistema de expresión no de mamífero." De manera similar, una "célula no de mamífero" es una célula derivada de un organismo distinto de un mamífero, ejemplos de las cuales incluyen bacterias o levadura.

Tal como se usa en el presente documento, el término "desnaturalizante" significa cualquier compuesto que tenga la capacidad de eliminar algo o todo de una estructura secundaria y terciaria de la proteína cuando se pone en contacto con la proteína. El término desnaturalizante se refiere a compuestos químicos particulares que afectan a la desnaturalización, así como a disoluciones que comprenden un compuesto particular que afecta a la desnaturalización. Los ejemplos de desnaturalizantes que pueden emplearse en el método dado a conocer incluyen, pero no se limitan a, urea, sales de guanidinio, dimetilurea, metilurea, etilurea y combinaciones de las mismas.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "supresor de la agregación" significa cualquier compuesto que tenga la capacidad de alterar y disminuir o eliminar las interacciones entre dos o más proteínas. Los ejemplos de supresores de la agregación pueden incluir, pero no se limitan a, aminoácidos tales como arginina, prolina y glicina; polioles y azúcares tales como glicerol, sorbitol, sacarosa y trehalosa; tensioactivos tales como, polisorbato-20, CHAPS, Triton X-100 y dodecilmaltósido; y combinaciones de los mismos.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "estabilizador de proteína" significa cualquier compuesto que tenga la capacidad de cambiar un estado de equilibrio de reacción de una proteína, de modo que se mejore o favorezca el estado nativo de la proteína. Los ejemplos de estabilizadores de proteína pueden incluir, pero no se limitan a, azúcares y alcoholes polihidroxilados tales como glicerol o sorbitol; polímeros tales como polietilenglicol (PEG) y α -ciclodextrina; aminoácidos sales tales como arginina, prolina y glicina; osmolitos y ciertas sales de Hoffmeister tales como Tris, sulfato de sodio y sulfato de potasio; y combinaciones de los mismos.
- 15 Tal como se usan en el presente documento, los términos "Fc" y "región Fc" se usan de manera intercambiable y significan un fragmento de un anticuerpo que comprende dominios de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} humanos o no humanos (por ejemplo, murinos), o que comprende dos regiones contiguas que son al menos un 90% idénticas a dominios de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} humanos o no humanos. Un Fc puede tener, pero no es necesario que tenga, la capacidad de interaccionar con un receptor de Fc. Véase, por ejemplo, Hasemann & Capra, "Immunoglobulins: Structure and Function", en William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Segunda Edición, 209, 210-218 (1989).
- 20 Tal como se usan en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se usan de manera intercambiable y significan cualquier cadena de al menos cinco aminoácidos que se producen de manera natural o de manera no natural unidos mediante enlaces peptídicos.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula compleja" significa cualquier proteína que sea (a) mayor de 20.000 MW, o comprenda más de 250 residuos de aminoácido, y (b) comprenda dos o más enlaces disulfuro en su forma nativa. Una molécula compleja puede, pero no es necesario que, forme multímeros. Los ejemplos de molécula complejas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, pepticuerpos y polipéptidos que comprenden un dominio Fc y otras proteínas grandes. Se describen pepticuerpos en la patente estadounidense n.º 6.660.843, la patente estadounidense n.º 7.138.370 y la patente estadounidense n.º 7.511.012.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "pepticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende uno o más péptidos bioactivos unidos entre sí, opcionalmente a través de ligadores, con un dominio Fc. Véase la patente estadounidense n.º 6.660.843, la patente estadounidense n.º 7.138.370 y la patente estadounidense n.º 7.511.012 para ejemplos de pepticuerpos.
- 35 Tal como se usan en el presente documento, los términos "fusión Fc" y "proteína de fusión Fc" se usan de manera intercambiable y hacen referencia a un péptido o polipéptido acoplado covalentemente a un dominio Fc.
- 40 Tal como se usa en el presente documento el término "proteína A" significa cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la proteína A estafilocócica, incluyendo las formas disponibles comercialmente y/o recombinantes de proteína A. Para los propósitos de esta invención, la proteína A incluye específicamente medios derivados de proteína A modificados mediante ingeniería, tal como medios Mab Select SuRe™ (GE Healthcare), en los que una única subunidad (por ejemplo, la subunidad B) se replica dos o más veces y se une a una secuencia contigua para formar una molécula de proteína A recombinante, y otras moléculas de proteína A que no se producen de manera natural.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína G" significa cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la proteína G estreptocócica, incluyendo las formas disponibles comercialmente y/o recombinantes de proteína G.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente similar", cuando se usa en el contexto de una proteína, incluyen proteína A, significa proteínas que son al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90% idénticas entre sí en la secuencia de aminoácidos y mantienen o alteran de una manera deseable la actividad biológica de la proteína inalterada. Incluidos en los aminoácidos considerados idénticos para el propósito de determinar si las proteínas son sustancialmente similar están los aminoácidos que son sustituciones conservativas, improbables de afectar a la actividad biológica, incluyendo los siguientes: Ala por Ser, Val por Ile, Asp por Glu, Thr por Ser, Ala por Gly, Ala por Thr, Ser por Asn, Ala por Val, Ser por Gly, Tyr por Phe, Ala por Pro, Lys por Arg, Asp por Asn, Leu por Ile, Leu por Val, Ala por Glu, Asp por Gly, y estos cambios a la inversa. Véase, por ejemplo, Neurath *et al.*, The Proteins, Academic Press, Nueva York (1979). El porcentaje de identidad de dos aminosecuencias puede determinarse mediante inspección visual y cálculo matemático, o más preferiblemente, la comparación se hace comparando información de secuencia usando un programa informático tal como el programa Wisconsin paquete de versión 10.0 de Genetics Computer Group (GCG; Madison, Wis.), "GAP" (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acids Res. 12: 387) u otros programas informáticos comparables. Los parámetros por defecto preferidos

- para el programa "GAP" incluyen: (1) la matriz de comparación de aminoácidos ponderada de Gribskov y Burgess ((1986), Nucl. Acids Res. 14: 6745), tal como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979), u otras matrices de comparación comparables; (2) una penalización de 30 para cada hueco y una penalización adicional de 1 para cada 5 símbolo en cada hueco para secuencias de aminoácidos; (3) ninguna penalización para huecos de extremo; y (4) ninguna penalización máxima para huecos largos. También pueden usarse otros programas usados por los expertos en la técnica de la comparación de secuencias.
- Tal como se usan en el presente documento, los términos "aislar" y "purificar" se usan de manera intercambiable y 10 significan reducir en un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o más, la cantidad de elementos heterogéneos, por ejemplo, macromoléculas 15 biológicas tales como proteínas o ADN, que pueden estar presentes en una muestra que comprende una proteína de interés. La presencia de proteínas heterogéneas puede someterse a ensayo mediante cualquier método apropiado, incluyendo cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), electroforesis en gel y tinción y/o ensayo ELISA. La presencia de ADN y otros ácidos nucleicos puede someterse a ensayo mediante cualquier método apropiado, incluyendo electroforesis en gel y tinción y/o ensayos que emplean la reacción en cadena de la 20 polimerasa.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "matriz de separación" significa cualquier material adsorbente 25 que utilice interacciones reversibles, específicas, entre moléculas sintéticas y/o biomoléculas, por ejemplo, la propiedad de la proteína A de unirse a una región Fc de un anticuerpo IgG u otra proteína que contiene Fc, con el fin de efectuar la separación de la proteína de su entorno. En otras realizaciones, las interacciones reversibles, específicas, pueden basarse en una propiedad tal como el punto isoeléctrico, la hidrofobicidad o el tamaño. En una 30 realización particular, una matriz de separación comprende un adsorbente, tal como proteína A, fijado a un soporte sólido. Véase, por ejemplo, Ostrove (1990) en "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology 182: 357-379.
- Tal como se usan en el presente documento, los términos "no nativa" y "forma no nativa" se usan de manera 35 intercambiable y cuando se usan en el contexto de una proteína de interés, tal como una proteína que comprende un dominio Fc, significan que la proteína carece de al menos un atributo de estructura formada encontrado en una forma de la proteína que es biológicamente activa en un ensayo *in vivo* o *in vitro* apropiado diseñado para evaluar la actividad biológica de la proteína. Los ejemplos de características estructurales que pueden estar ausentes en una 40 forma no nativa de una proteína pueden incluir, pero no se limitan a, un enlace disulfuro, una estructura cuaternaria, una estructura secundaria o terciaria alterada o un estado que hace que la proteína sea biológicamente inactiva en un ensayo apropiado. Una proteína en una forma no nativa puede, pero no es necesario que, forme agregados.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "forma soluble no nativa" cuando se usa en el contexto de 45 una proteína de interés, tal como una proteína que comprende un dominio Fc, significa que la proteína carece de al menos un atributo de estructura formada encontrado en una forma de la proteína que es biológicamente activa en un ensayo *in vivo* o *in vitro* apropiado diseñado para evaluar la actividad biológica de la proteína, pero en la que la proteína se expresa en una forma o estado que es soluble intracelularmente (por ejemplo, en el citoplasma de la 50 célula) o extracelularmente (por ejemplo, en un conjunto de lisado).
- Tal como se usa en el presente documento, el término "forma de solubilidad limitada no nativa" cuando se usa en el contexto de una proteína de interés, tal como una proteína que comprende un dominio Fc, significa cualquier forma o 55 estado en el que la proteína carece de al menos una característica estructural formada encontrada en una forma de la proteína que (a) es biológicamente activa en un ensayo *in vivo* o *in vitro* apropiado diseñado para evaluar la actividad biológica de la proteína y/o (b) forma agregados que requieren tratamiento, tal como tratamiento químico, para volverse soluble. El término incluye específicamente proteínas que existen en cuerpos de inclusión, tales como aquellas encontradas en ocasiones, cuando una proteína recombinante se expresa en un sistema de expresión no de mamífero.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "forma soluble" cuando se usa en el contexto de una proteína de interés, tal como una proteína que comprende un dominio Fc, se refiere ampliamente a una forma o estado en el que la proteína se expresa en una forma que es soluble en una intracelularmente (por ejemplo, en el citoplasma de la 60 célula) o extracelularmente (por ejemplo, en un conjunto de lisado celular).
- II. Captura directa de una proteína expresada en una forma soluble no nativa en un sistema de expresión no de mamífero (no parte de la invención)
- Una ventaja del método no reivindicado, dado a conocer, con respecto a los métodos de purificación típicos es la 65 eliminación de la necesidad de una etapa de replegamiento antes de aplicar la proteína soluble a la matriz de separación. Es decir, una proteína solubilizada en lisado celular puede aplicarse directamente a la matriz de separación. Esto es ventajoso porque el método no requiere ningún esfuerzo de purificación inicial, aunque en algunos casos puede ser deseable una etapa de filtración inicial.

En el caso de una proteína que comprende un dominio Fc, la región Fc tiene que tener un cierto nivel de estructura para unirse mediante la proteína A, (Wang *et al.*, (1997) Biochem. J. 325(Part 3):707-710). Este hecho ha limitado la aplicación de matrices de separación para purificar proteínas que se expresan en una forma soluble no nativa, particularmente proteínas que comprenden una región Fc, porque se cree comúnmente que una proteína que contiene Fc no nativa soluble no tendría los elementos estructurales requeridos para asociarse con una matriz de separación. Además, la región Fc de un anticuerpo forma de manera espontánea un homodímero en condiciones no reductoras y antes de la presente divulgación no era de esperar observar que incluso en el entorno reductor de la célula, las proteínas y péptidos conjugados con Fc no solo formasen una estructura suficiente para que la proteína se uniese a la resina de afinidad, sino que las cadenas peptídicas individuales formasen fácilmente dímeros no covalentes, aunque la proteína no se hubiesen replegado completamente aún a la forma nativa.

En vista de las creencias predominantes, el éxito del método dado a conocer fue sorprendente y no estaba anticipado, porque no era de esperar que pudiese inducirse una fermentación de célula microbiana, no de mamífero, para producir una proteína que fuera soluble, pero que tuviera suficiente estructura para asociarse con la matriz de separación de afinidad.

El método dado a conocer puede emplearse para purificar una proteína de interés que se expresa en una forma soluble no nativa en un sistema de expresión de célula no de mamífero. La proteína de interés puede producirse mediante células huésped vivas que o bien producen de manera natural la proteína o bien se han modificado mediante ingeniería genética para producir la proteína. En la técnica se conocen métodos de modificación mediante ingeniería genética de células para producir proteínas. Véase, por ejemplo, Ausabel *et al.*, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York). Tales métodos incluyen introducir ácidos nucleicos que codifican para y permiten la expresión de la proteína en células huésped vivas. En el contexto de la presente divulgación, una célula huésped será una célula no de mamífero, tal como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura y células de insecto. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 y cualquier cepa de *E. coli* que no consiga escindir ADN foráneo. Las células huésped fúngicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Pueden establecerse nuevas líneas celulares usando métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección viral y/o selección). Se indica que el método puede realizarse también sobre proteínas que se expresan de manera endógena por la célula no de mamífero.

Durante la producción de un cultivo no de mamífero, las condiciones de crecimiento pueden identificarse y emplearse para favorecer la producción de una proteína de interés en una forma soluble intracelular. Tales condiciones pueden identificarse mediante la optimización empírica sistemática de los parámetros de condiciones de cultivo, tales como temperatura o pH. Esta optimización puede conseguirse usando análisis de matrices multifactoriales. Por ejemplo, puede evaluarse una matriz o serie de matrices multifactoriales para optimizar que las condiciones de temperatura y pH favorezcan la producción de una especie deseada (es decir, una forma soluble no nativa). Puede configurarse un examen de optimización para evaluar sistemáticamente la temperatura y el pH en una matriz factorial completa o parcial, con cada componente variado a lo largo de un intervalo de al menos tres niveles de temperatura o pH manteniendo todos los demás parámetros constantes. La proteína puede expresarse y el rendimiento y la calidad de la proteína expresada en la forma deseada pueden evaluarse usando herramientas estadísticas multivariantes estándar.

Inicialmente, las células no de mamífero que expresan una proteína de interés particular se hacen crecer hasta una densidad objetivo deseada en condiciones diseñadas para inducir la expresión de la proteína en una forma soluble. Las células expresan una proteína de interés de tipo silvestre. Las células pueden modificarse mediante ingeniería usando técnicas de biología molecular estándar para expresar de manera recombinante una proteína de interés, e inducirse para producir la proteína de interés. La proteína de interés puede ser cualquier proteína, por ejemplo, una proteína que comprende un resto Fc. Una proteína de este tipo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un pepticuerpo o una proteína de fusión Fc, cualquier de los cuales puede unirse a un resto Fc por medio de un ligador.

Una vez que se ha alcanzado la densidad diana deseada, las células no de mamífero se separan de los medios de crecimiento. Una manera conveniente de conseguir la separación es mediante centrifugación, sin embargo también pueden usarse filtración y otros métodos de clarificación.

Las células se recogen entonces y se resuspenden hasta un volumen apropiado en una disolución de resuspensión. Los ejemplos de disoluciones de resuspensión que pueden usarse en los métodos dados a conocer incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris o agua. La selección de un tampón apropiado estará determinada, en parte, por las propiedades de la molécula de interés así como cualquier restricción de volumen o de concentración.

Tras la resuspensión, las células no de mamífero se lisán para liberar la proteína, que estará presente en el lisado celular en una forma soluble no nativa para generar un lisado celular. La lisis puede realizarse usando cualquier medio conveniente, tales como alimentar la suspensión celular a través de un homogeneizador de alta presión o empleando un proceso de lisis química. Cualquiera que sea el proceso lítico seleccionado, la función de la etapa de

lisis es abrir las células y descomponer el ADN. La lisis puede realizarse en múltiples ciclos para conseguir una lisis más completa o para dar cabida a grandes volúmenes de suspensión celular. Por ejemplo, la suspensión celular puede alimentarse a través de un homogeneizador mecánico varias veces. Este proceso libera los contenidos intracelulares, incluyendo la proteína de interés, y forma un conjunto de lisado celular.

5 Tras el procedimiento de lisis, el lisado celular puede filtrarse opcionalmente. La filtración puede eliminar materia particulada y/o impurezas, tales como ácidos nucleicos y lípidos, y puede ser deseable en algunos casos, tal como cuando se sospecha que la aplicación directa del lisado celular a los medios o equipos de cromatografía puede conducir a incrustación u obstrucción, o cuando la matriz de separación es sensible a la incrustación o difícil de limpiar *in situ*. El beneficio de filtrar el lisado celular antes de ponerlo en contacto con la matriz de separación puede determinarse caso por caso.

10 Despues del procedimiento de lisis, el lisado celular puede incubarse opcionalmente durante una cantidad apropiada de tiempo en presencia de aire u oxígeno, o exponerse a un componente redox o un par de tiol redox. La incubación 15 puede facilitar y/o garantizar la formación de la estructura secundaria mínima requerida para facilitar una asociación con una matriz de separación. La duración particular de la incubación puede variar con la proteína, pero es normalmente menor de 72 horas (por ejemplo, 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 18, 24, 36, 48 o 72 horas). Cuando se realiza una incubación, la duración del tiempo de incubación puede determinarse mediante análisis empírico para 20 cada proteína, que en algunos casos será más corto (o se omitirá) y en otros casos más largo.

25 Tras el periodo de incubación el lisado celular, que comprende la proteína de interés liberada, se pone en contacto con una matriz de separación en condiciones adecuadas para que la proteína se asocie con un elemento de unión de la matriz de separación. Condiciones representativas propicias para la asociación de una proteína con una matriz de afinidad se proporcionan en los ejemplos. La matriz de separación puede ser cualquier medio mediante el que la proteína de interés pueda separarse de los componentes del tampón de resuspensión y/o de lisis, incluyendo impurezas tales como lípidos, ADN, proteínas de células huésped e impurezas químicas introducidas por los componentes del tampón de resuspensión y/o de lisis.

30 A menudo se emplean proteínas A y G para purificar anticuerpos, pepticuerpos y otras proteínas de fusión que comprenden una región Fc mediante cromatografía de afinidad. Véanse, por ejemplo, Vola *et al.* (1994), Cell Biophys. 24-25: 27-36; Aybay e Imir (2000), J. Immunol. Methods 233(1-2): 77-81; Ford *et al.* (2001), J. Chromatogr. B 754: 427-435. Las proteínas A y G son útiles a este respecto porque se unen a la región Fc de estos tipos de 35 proteínas. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una región Fc de un anticuerpo IgG pueden purificarse usando métodos similares. Las proteínas A y G pueden emplearse en los métodos dados a conocer como componente adsorbente de una matriz de separación.

40 Por tanto, los ejemplos de matrices de separación que pueden emplearse en la presente invención incluyen resina de proteína A, que se conoce que es, y se emplea comúnmente como, un agente efectivo para purificar moléculas que comprenden un resto Fc, así como resinas de proteína G y de afinidad miméticas sintéticas, tal como resina de cromatografía MEP Hyper-Cel®.

45 Despues de que la proteína de interés se haya asociado con la matriz de separación poniendo en contacto el lisado celular que contiene la proteína con la matriz de separación, permitiendo de ese modo que la proteína se asocie con el componente adsorbente de la matriz de separación, la matriz de separación se lava para eliminar el lisado no unido y las impurezas.

50 El tampón de lavado puede ser de cualquier composición, siempre que la composición y el pH del tampón de lavado sea compatible tanto con la proteína como con la matriz, y mantenga la interacción entre la proteína y la matriz. Los ejemplos de tampones de lavado adecuados que pueden emplearse incluyen disoluciones que contienen glicina, Tris, citrato o fosfato; normalmente a niveles de 5-100 mM (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 mM). Estas disoluciones también pueden contener un ion de sal apropiado, tal como cloruro, sulfato o acetato a niveles de 5-500 mM (por ejemplo, 5, 10, 12, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mM). La resina puede lavarse una vez o cualquier número de veces. La composición exacta de un tampón de lavado variará con la proteína que esté purificándose.

55 Despues de haber lavado la matriz de separación con la que se ha asociado la proteína, la proteína de interés se eluye de la matriz usando una disolución apropiada. La proteína de interés puede eluirse usando una disolución que interfiere con la unión del componente adsorbente de la matriz de separación a la proteína, por ejemplo, alterando las interacciones entre la matriz de separación y la proteína de interés. Esta disolución puede incluir un agente que 60 puede o bien aumentar o bien disminuir el pH, y/o una sal. Por ejemplo, el pH puede disminuirse hasta aproximadamente 4,5 o menos, por ejemplo, hasta entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 4,0, por ejemplo, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4 o 4,5. Una disolución que comprende citrato o acetato, por ejemplo, puede emplearse para disminuir el pH. También se conocen otros métodos de elución, tal como por medio del uso de caótropos (véase, por ejemplo, Ejima *et al.* (2005) Analytical Biochemistry 345(2):250-257) o sales de aminoácido (véase, por ejemplo, Arakawa *et al.* (2004) Protein Expression & Purification 36(2):244-248). En la técnica se conocen ampliamente protocolos para tal cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Miller y Stone 65

- (1978), *J. Immunol. Methods* 24(1-2): 111-125. Las condiciones para la unión y la elución pueden optimizarse fácilmente por parte de los expertos en la técnica. La composición exacta de un tampón de elución variará con la proteína que esté purificándose. La proteína puede entonces opcionalmente purificarse adicionalmente del conjunto de elución y replegarse según sea necesario. En otras situaciones no es necesario que la proteína se purifique adicionalmente y en su lugar puede replegarse directamente del conjunto de elución. El replegamiento directo del conjunto de elución puede requerir o no la desnaturalización o reducción de la proteína antes de la incubación en una disolución de replegamiento y dependerá en parte de las propiedades de la proteína.
- 5 En algunos casos será deseable proporcionar la matriz de separación en un formato de columna. En tales casos 10 puede prepararse una columna de cromatografía y entonces equilibrarse antes de cargar la suspensión celular. Técnicas para generar una columna de cromatografía se conocen ampliamente y pueden emplearse. Una etapa de preparación y equilibrado opcional puede comprender lavar la columna con un tampón que tenga un pH apropiado y una condición de sal que sea propicia para interacciones proteína-matriz. Esta etapa puede proporcionar el beneficio 15 de eliminar las impurezas presentes en la matriz de separación y puede potenciar la unión de la proteína que debe aislarse al componente adsorbente de una matriz de separación.
- Como se ha indicado, la matriz de separación puede disponerse en una columna. La columna puede hacerse 20 funcionar con o sin presión y de arriba abajo o de abajo arriba. El sentido del flujo de fluido en la columna puede invertirse durante el proceso de purificación. También pueden llevarse a cabo purificaciones usando un proceso por lotes en el que el soporte sólido se separa del líquido usado para cargar, lavar y eluir la muestra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo gravedad, centrifugación o filtración. Además, también pueden llevarse a cabo 25 purificaciones poniendo en contacto la muestra con un filtro que adsorbe o retiene algunas moléculas en la muestra más fuertemente que otras, tal como una cromatografía de membrana de intercambio aniónico.
- 25 Si se desea, puede determinarse la concentración de proteína de una muestra en cualquier etapa dada del método dado a conocer y puede emplearse cualquier método adecuado. Tales métodos se conocen ampliamente en la 30 técnica e incluyen: 1) métodos colorimétricos tales como el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford, el ensayo de Smith y el ensayo de oro coloidal; 2) métodos que utilizan las propiedades de absorción de UV de proteínas; y 3) estimación visual basada en bandas de proteína teñidas sobre geles basándose en la comparación con estándares 35 de proteína de calidad conocida sobre el mismo gel. Véase, por ejemplo, Stoschek (1990), "Quantitation of Protein", en "Guide to Protein Purification", *Methods in Enzymology* 182: 50-68. Determinaciones periódicas de la concentración de proteína pueden ser útiles para monitorizar el progreso del método a medida que se realiza.
- 35 Se indica que cualquiera de o todas las etapas de los métodos dados a conocer pueden llevarse a cabo manualmente o mediante cualquier medio automatizado conveniente, tal como empleando sistemas automatizados o controlados por ordenador.
- III. Captura directa de formas de proteína de solubilidad limitada no nativas de una disolución de replegamiento tras la expresión en células no de mamífero
- 40 En otro aspecto de la presente divulgación se da a conocer un método de purificación de una proteína expresada en una forma de solubilidad limitada no nativa en un sistema de expresión no de mamífero. Una ventaja del método dado a conocer es que el método elimina la necesidad de eliminar o diluir la disolución de replegamiento antes de 45 aplicar la proteína a una matriz de separación, ahorrando de ese modo el tiempo y los recursos asociados con lo que es una etapa típica en un proceso de purificación para aislar proteínas expresadas en una forma de solubilidad limitada no nativa.
- 50 Células no de mamífero, por ejemplo, células microbianas, pueden producir proteínas recombinantes que se expresan intracelularmente o bien en una forma soluble o bien en una forma de solubilidad limitada. Cuando las condiciones de crecimiento no van dirigidas a forzar la expresión de la proteína en una forma soluble, las células pueden depositar las proteínas recombinantes en grandes agregados relativamente insolubles, tales como cuerpos de inclusión. Estos agregados comprenden proteína que normalmente no es biológicamente activa o menos activa que la forma nativa completamente plegada de la proteína. Con el fin de producir una proteína funcional, a menudo 55 es necesario desnaturalizar cuidadosamente estos cuerpos de inclusión de modo que la proteína de interés puede extraerse y replegarse en una forma biológicamente activa.
- 55 En enfoques típicos, es necesario capturar los cuerpos de inclusión, lavarlos, exponerlos a una disolución de solubilización desnaturalizante y/o reductora y entonces la disolución de desnaturalización se diluye con una disolución para generar una condición que permite que la proteína se repliegue en una forma activa y forme una estructura que se encuentra en la proteína nativa. Posteriormente, es necesario eliminar los componentes de la disolución desnaturalizante diluida de la ubicación inmediata de la proteína. Con el fin de hacer esto, la disolución de replegamiento que comprende la disolución de solubilización y la proteína replegada se diluye normalmente con una disolución tamponada antes de aplicarse a una matriz de separación, tal como un intercambio iónico de proteína A u otros adsorbentes de modo mixto. Este proceso puede requerir mucho tiempo y muchos recursos. También aumenta 60 significativamente los volúmenes que es necesario manejar, así como los requisitos de almacenamiento en tanque 65

asociados, que pueden volverse limitantes cuando se trabaja a grandes escalas. El método dado a conocer elimina la necesidad de una etapa de dilución de este tipo.

- 5 El método dado a conocer es particularmente útil para purificar una proteína de interés que se expresa en una forma de solubilidad limitada no nativa en un sistema de expresión de célula no de mamífero. La proteína de interés puede producirse mediante células huésped vivas que o bien producen de manera natural la proteína o bien se han modificado mediante ingeniería genética para producir la proteína. En la técnica se conocen ampliamente métodos de modificación mediante ingeniería genética de células para producir proteínas. Véase, por ejemplo, Ausabel *et al.*, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York). Tales métodos incluyen introducir ácidos
- 10 nucleicos que codifican para y permiten la expresión de la proteína en células huésped vivas. En el contexto de la presente divulgación, estas células huésped serán células no de mamífero, tales como células bacterianas, células fúngicas. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5α, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 y cualquier cepa de *E. coli* que no consiga escindir ADN foráneo. Las células huésped fúngicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Pueden establecerse nuevas líneas celulares usando métodos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección viral y/o selección). Se indica que el método también puede realizarse en proteínas endógenas que se expresan de manera natural por la célula no de mamífero.
- 15 20 Inicialmente, las células no de mamífero que expresan una proteína de interés particular se hacen crecer hasta una densidad objetivo deseada. En una realización, las células pueden expresar una proteína de interés microbiana de tipo silvestre particular. En otra realización, las células pueden modificarse mediante ingeniería usando técnicas de biología molecular estándar para expresar de manera recombinante una proteína de interés, y en este contexto pueden inducirse para sobreproducir la proteína de interés. La proteína de interés puede ser cualquier proteína, por ejemplo, una proteína que comprende un resto Fc. Una proteína de este tipo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un pepticuerpo o una proteína de fusión Fc, cualquier de los cuales puede unirse a un resto Fc por medio de un ligador.
- 25 30 Una vez que se ha alcanzado la densidad diana deseada, las células no de mamífero pueden separarse de los medios de crecimiento. Una manera conveniente de conseguir la separación es mediante centrifugación, sin embargo también pueden usarse filtración y otros métodos de clarificación.
- 35 Las células se recogen entonces y se resuspenden hasta un volumen apropiado en una disolución de resuspensión. Los ejemplos de disoluciones de resuspensión que pueden usarse en la presente invención incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris o agua. La selección de un tampón apropiado estará determinada, en parte, por las propiedades de la molécula de interés así como cualquier restricción de volumen o de concentración.
- 40 45 Con el fin de liberar la proteína no nativa de solubilidad limitada de las células, las células no de mamífero se lisan para formar un lisado celular que comprende la proteína no nativa de solubilidad limitada liberada. La lisis puede realizarse de cualquier manera conveniente, tal como alimentando la suspensión celular a través de un homogeneizador de alta presión o empleando un proceso de lisis química. Cualquier que sea el proceso de lisis que se seleccione, la función de la etapa de lisis es abrir las células y descomponer el ADN. La lisis puede realizarse en múltiples ciclos para conseguir una lisis más completa o para dar cabida a grandes volúmenes de suspensión celular. Por ejemplo, la suspensión celular puede alimentarse a través de un homogeneizador mecánico varias veces. Este proceso libera los contenidos intracelulares, incluyendo la proteína de interés que se produce de manera natural o recombinante, y forma un conjunto de lisado celular.
- 50 55 A continuación, la proteína no nativa de solubilidad limitada se separa del resto del conjunto de lisis. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante centrifugación. Las condiciones representativas para un lavado o separación mediada por centrífuga incluyen normalmente la eliminación del agua en exceso del lisado celular, la resuspensión de la suspensión espesa resultante en una disolución de resuspensión. Este proceso de lavado puede realizarse una vez o múltiples veces. Los ejemplos de tipos de centrífuga típicos incluyen, pero no se limitan a, pila de discos, descarga continua y de cuento tubular. Los ejemplos de disoluciones de resuspensión que pueden usarse en la presente invención incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris o agua, y pueden incluir otros agentes, tales como EDTA u otras sales. La selección de un tampón apropiado estará determinada, en parte, por las propiedades de la molécula de interés así como cualquier restricción de volumen o de concentración. La composición exacta de un tampón de resuspensión variará con la proteína que esté purificándose.
- 60 65 La proteína expresada se solubiliza entonces en una disolución de solubilización que comprende uno o más de (i) un desnaturalizante y (ii) un reductor. El desnaturalizante puede incluirse como medio de despliegamiento de la proteína de solubilidad limitada, eliminando de este modo cualquier estructura existente, exponiendo los residuos enterrados y haciendo que la proteína sea más soluble.
- Puede emplearse cualquier desnaturalizante en la disolución de solubilización. Los ejemplos de algunos desnaturalizantes comunes que pueden emplearse en el tampón de replegamiento incluyen urea, guanidinio,

dimetilurea, metilurea o etilurea. La concentración específica del desnaturizante puede determinarse mediante optimización rutinaria.

5 El reductor puede incluirse como medio para reducir los residuos expuestos que tienen una propensión a formar enlaces de proteína intra- o intermoleculares covalentes y minimizar la formación de enlaces no específicos. Los ejemplos de reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a, cisteína, DTT, beta-mercaptopropano y glutatión. La concentración específica del reductor puede determinarse mediante optimización rutinaria.

10 Aunque la composición de una disolución de solubilización variará con la proteína que esté purificándose, en una realización particular la disolución de solubilización comprende guanidina 4-6 M, DTT 50 mM.

15 Continuando, se forma una disolución de replegamiento que comprende la disolución de solubilización (que comprende la proteína) y un tampón de replegamiento. El tampón de replegamiento comprende uno o más de (i) un desnaturizante; (ii) un supresor de la agregación; (iii) un estabilizador de proteína; y (iv) un componente redox. El desnaturizante puede incluirse como medio de modificación de la termodinámica de la disolución, desplazando de ese modo el equilibrio hacia un equilibrio óptimo de forma nativa. El supresor de la agregación puede incluirse como medio de prevención de una asociación no específica de una proteína con otra, o con una región de una proteína con otra región de la misma proteína. El estabilizador de proteína puede incluirse como medio de promover una estructura de proteína nativa estable y también puede suprimir la agregación.

20 En diversas realizaciones, el desnaturizante en el tampón de replegamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en urea, sales de guanidinio, dimetilurea, metilurea y etilurea.

25 En diversas realizaciones, el estabilizador de proteína en el tampón de replegamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en arginina, prolina, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, Tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos.

30 En diversas realizaciones, el supresor de la agregación puede seleccionarse del grupo que consiste en arginina, prolina, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, Tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos.

En diversas realizaciones, los pares de tiol pueden comprender al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en glutatión reducido, glutatión oxidado, cisteína, cistina, cisteamina, cistamina y beta-mercaptopropano.

35 Las concentraciones específicas de los componentes de un tampón de replegamiento pueden determinarse mediante optimización rutinaria. Por ejemplo, puede evaluarse una matriz o serie de matrices multifactoriales para optimizar el tampón de replegamiento para condiciones que optimicen el rendimiento y las distribuciones de especies deseadas. Puede configurarse un examen de optimización para evaluar sistemáticamente las concentraciones y proporciones de desnaturizante, supresor de la agregación, estabilizador de proteína y componente redox en una matriz factorial completa o parcial, variándose cada componente a lo largo de un intervalo de concentraciones con todos los demás parámetros manteniéndose constantes. Las reacciones completadas pueden evaluarse mediante análisis de RP-HPLC y SE-HPLC para determinar el rendimiento y la calidad del producto usando herramientas estadísticas multivariantes estándar.

45 40 La función del componente de tampón de la disolución de replegamiento es mantener el pH de la disolución de replegamiento y puede comprender cualquier tampón que tampona en el intervalo de pH apropiado. Los ejemplos del componente de tamponamiento de un tampón de replegamiento que puede emplearse en el método incluyen, pero no se limitan a, tampones fosfato, tampones citrato, tampones tris, tampones glicina, CHAPS, CHES y tampones a base de arginina, normalmente a niveles de 5-100 mM (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM).

50 Aunque la composición de un tampón de replegamiento variará con la proteína que esté purificándose, en una realización un tampón de replegamiento comprende arginina, urea, glicerol, cisteína y cistamina.

55 50 La disolución de replegamiento puede incubarse entonces durante un periodo de tiempo deseado. El periodo de incubación puede ser de cualquier duración, pero es normalmente de entre 0 y 72 horas (por ejemplo, 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 18, 24, 36, 48 o 72 horas).

60 55 Después de un tiempo de incubación apropiado, la disolución de replegamiento se aplica entonces a una matriz de separación en condiciones adecuadas para que la proteína se asocie con la matriz. La matriz de separación puede ser cualquier medio mediante el cual la proteína de interés pueda separarse de los componentes del tampón de resuspensión y/o de lisis, incluyendo impurezas tales como ADN, proteínas de células huésped e impurezas químicas introducidas por los componentes del tampón de solubilización y/o de lisis.

65 60 A menudo se emplean proteínas A y G para purificar anticuerpos, pepticuerpos y otras proteínas de fusión que comprenden una región Fc mediante cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Vola *et al.* (1994), Cell Biophys.

24-25: 27-36; Aybay e Imir (2000), *J. Immunol. Methods* 233(1-2): 77-81; Ford *et al.* (2001), *J. Chromatogr. B* 754: 427-435. Las proteínas A y G son útiles a este respecto porque se unen a la región Fc de estos tipos de proteínas. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una región Fc de un anticuerpo IgG pueden purificarse usando métodos similares. Las proteínas A y G pueden emplearse en los métodos dados a conocer como componente adsorbente de una matriz de separación.

5 Por tanto, los ejemplos de matrices de separación de afinidad que pueden emplearse en la presente invención incluyen resina de proteína A, que se conoce que es, y se emplea comúnmente como, un agente efectivo para purificar moléculas que comprenden un resto Fc, así como resinas de proteína G y de afinidad miméticas sintéticas. 10 Otros materiales que pueden emplearse incluyen HIC y resinas de intercambio iónico (véase el ejemplo 4), dependiendo de las propiedades de la proteína que deba purificarse.

15 Se indica que cuando se realiza el método, la disolución de replegamiento que comprende la proteína replegada de interés se aplica directamente a la matriz de separación, sin la necesidad de diluir o eliminar los componentes de la disolución requerida para el replegamiento de la proteína. Esto es una ventaja del método dado a conocer. Inicialmente, se esperaba que los compuestos altamente iónicos y/o caotrópicos y otros diversos componentes de la disolución de replegamiento inhibiesen la asociación de la proteína con la matriz de separación. Sin embargo, a diferencia de los informes en la bibliografía (por ejemplo, Wang *et al.* (1997) *Biochemical Journal* 325(Part 3):707-710), fue sorprendente observar que la proteína era de hecho capa de asociarse con la matriz de separación en presencia de los componentes de la disolución de replegamiento. El hallazgo inesperado de que la proteína podía asociarse con la matriz de separación en presencia de los componentes de la disolución de replegamiento facilita la eliminación de una etapa de dilución u operación de intercambio de tampón, proporcionando ahorros de tiempo y recursos.

25 20 Despues de que la proteína de interés se haya asociado con la matriz de separación, la matriz de separación se lava para eliminar la proteína no unida, lisado, impurezas y componentes no deseados de la disolución de replegamiento.

30 35 El tampón de lavado puede ser de cualquier composición, siempre que la composición y el pH del tampón de lavado sea compatible tanto con la proteína como con la matriz. Los ejemplos de tampones de lavado adecuados que pueden incluir, pero se limitan a, disoluciones que contienen glicina, tris, citrato o fosfato. Estas disoluciones también pueden contener una sal apropiada. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato y/o citrato. El intervalo de pH se elige para optimizar las condiciones de cromatografía, preservar la unión a proteína y conservar las características deseadas de la proteína de interés. La resina puede lavarse una vez o cualquier número de veces. La composición exacta de un tampón de lavado variará con la proteína que esté purificándose.

40 45 Despues de lavar la matriz de separación con la que se ha asociado la proteína, la proteína de interés se eluye usando una disolución apropiada (por ejemplo, una disolución tamponada de pH bajo o una disolución de sal) para formar un conjunto de elución que comprende la proteína de interés.

50 55 La proteína de interés puede eluirse usando una disolución que interfiere con la unión del componente adsorbente de la matriz de separación a la proteína, por ejemplo, alterando las interacciones entre la proteína A y la región Fc de una proteína de interés. Esta disolución puede incluir un agente que puede o bien aumentar o bien disminuir el pH, y/o una sal. En diversas realizaciones, la disolución de elución puede comprender ácido acético, glicina o ácido cítrico. La elución puede conseguirse disminuyendo el pH. Por ejemplo, el pH puede disminuirse hasta aproximadamente 4,5 o menos, por ejemplo, hasta entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 4,2 (por ejemplo, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 o 4,2, usando una disolución que comprende citrato o acetato, entre otras posibilidades).

60 65 50 No es necesario que la proteína se purifique adicionalmente y en su lugar puede replegarse adicionalmente de manera directa en el conjunto de elución, si es necesario.

60 En la técnica se conocen protocolos para tal cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Miller y Stone (1978), *J. Immunol. Methods* 24(1-2): 111-125. En los casos que utilizan cromatografía de intercambio iónico, de modo mixto o de interacción hidrófoba, a concentración de sal puede aumentarse o disminuirse para alterar la interacción iónica entre la proteína unida y una matriz de separación. Las disoluciones apropiadas para efectuar tales eluciones pueden incluir, pero no se limitan a, sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato y/o citrato. También se conocen otros métodos de elución. Las condiciones para la unión y la elución pueden optimizarse fácilmente por parte de los expertos en la técnica.

65 60 La composición exacta de un tampón de elución variará con la proteína que esté purificándose y la matriz de separación que esté empleándose.

65 En algunos casos será deseable situar la matriz de separación en un formato de columna. En tales casos, puede prepararse una columna y entonces equilibrarse antes de cargar la suspensión celular. Técnicas para generar una columna de cromatografía se conocen ampliamente y pueden emplearse. La etapa de preparación y equilibrado

opcional puede comprender lavar la columna con un tampón que tenga un pH y una composición adecuados que preparará los medios para unirse a una proteína de interés. Esta etapa tiene el beneficio de eliminar las impurezas presentes en la matriz de separación y puede potenciar la unión de la proteína que debe aislarse al componente adsorbente de una matriz de separación.

- 5 Se indica que cualquiera de o todas las etapas de la invención pueden llevarse a cabo mediante cualquier medio mecánico. Como se ha indicado, la matriz de separación puede disponerse en una columna. La columna puede hacerse funcionar con o sin presión y de arriba abajo o de abajo arriba. El sentido del flujo de fluido en la columna puede invertirse durante el proceso de purificación. También pueden llevarse a cabo purificaciones usando un proceso por lotes en el que el soporte sólido se separa del líquido usado para cargar, lavar y eluir la muestra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo gravedad, centrifugación o filtración. Además, también pueden llevarse a cabo purificaciones poniendo en contacto la muestra con un filtro que adsorbe o retiene algunas moléculas en la muestra más fuertemente que otras.
- 10 15 Si se desea, la concentración de proteína de una muestra en cualquier etapa dada del método dado a conocer puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Tales métodos se conocen ampliamente en la técnica e incluyen: 1) métodos colorimétricos tales como el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford, el ensayo de Smith y el ensayo de oro coloidal; 2) métodos que utilizan las propiedades de absorción de UV de proteínas; y 3) estimación visual basada en bandas de proteína teñidas sobre geles basándose en la comparación con estándares de proteína de calidad conocida sobre el mismo gel. Véase, por ejemplo, Stoschek (1990), "Quantitation of Protein", en "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology 182: 50-68. Determinaciones periódicas de la concentración de proteína pueden ser útiles para monitorizar el progreso del método a medida que se realiza.
- 20 25 Se indica que cualquiera de o todas las etapas de los métodos dados a conocer pueden llevarse a cabo manualmente o mediante cualquier medio automatizado conveniente, tal como empleando sistemas automatizados o controlados por ordenador.

IV. Limpieza de la columna

- 30 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a la observación de que en muchos casos la matriz de separación empleada en los métodos proporcionados en el presente documento puede limpiarse después de múltiples separaciones y reutilizarse. Esta propiedad inesperada del método proporciona ahorros de costes y de recursos a significativos, particularmente en la escala de fabricación, dado que no es necesario desechar la matriz de separación después de que una separación esté completa.
- 35 40 45 La sabiduría común en la industria sugiere que después de que una matriz de separación, tal como proteína A, se haya expuesto repetidamente a materias primas altamente heterogéneas que comprenden un alto contenido de lípido y de proteína huésped, se contamina de manera irreversible y se vuelve inútil cuando se trata con las disoluciones de regeneración suaves utilizadas comúnmente para resinas de afinidad a base de proteína. Sin embargo, los métodos dados a conocer evitan esta situación y prolongan la vida útil de una matriz de separación. En el contexto de un proceso de fabricación a gran escala, esto puede traducirse en ahorros medibles de tiempo y dinero. Además, la etapa de limpieza puede realizarse, tal como se da a conocer en los ejemplos, *in situ* y sin la necesidad de extraer la matriz de separación de una columna u otro dispositivo de retención de matriz para su limpieza, por tanto ahorrando tiempo y recursos.
- 50 En una realización de una operación de limpieza de una matriz de separación, tras una separación empleando el método dado a conocer, la matriz de separación se lava con un reactivo de regeneración, tal como hidróxido de sodio, o un reactivo ácido, tal como ácido fosfórico.
- 55 En una realización particular de una operación de limpieza, proteína A es la matriz de separación y una columna que contiene resina de proteína A se lava con 5 volúmenes de columna de ácido fosfórico 150 mM y se mantiene durante >15 minutos a través de la columna. Tras el lavado con el ácido, la columna puede lavarse con agua, regenerarse con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M, DTT 50 mM, pH 7,4, posteriormente lavarse con agua y entonces lavarse con 3 volúmenes de columna de ácido fosfórico 150 mM. Este protocolo de limpieza se ha utilizado para conseguir más de 200 ciclos de resina de proteína A. La Figura 3 resalta los resultados que pueden conseguirse usando los métodos de limpieza dados a conocer.

EJEMPLOS

- 60 Los siguientes ejemplos demuestran divulgaciones no reivindicadas, así como realizaciones y aspectos de la presente invención y no pretenden ser limitativos.

Ejemplo 1

- 65 Captura directa de proteínas expresadas en una forma soluble usando cromatografía de afinidad de proteína A (no parte de la invención)

El siguiente experimento demuestra que una proteína que comprende una pluralidad de polipéptidos unidos a un resto Fc puede separarse de una suspensión espesa de lisado celular de *E. coli* usando un medio de afinidad de proteína A.

5 Una proteína que comprende una pluralidad de polipéptidos unidos a un resto Fc se expresó en una fermentación de *E. coli* inducida a 30°C y llevada a expresar producto de proteína de forma soluble. El caldo de fermentación se centrífugó, la fracción líquida se eliminó y la pasta celular se recogió. Las células se resuspendieron en una disolución de tampón fosfato de potasio 10 mM, EDTA 5 mM; pH 6,8, hasta aproximadamente el 100% del volumen original. Las células se lisaron entonces por medio de tres pasos a través de un homogeneizador de alta presión. Despues de haber lisado las células, el lisado celular se filtró a través de un filtro de 0,1 µm para reducir los niveles de partículas. El material se almacenó entonces en un frasco cerrado durante ~ 24 horas a aproximadamente 5°C.

10 15 En una operación independiente, una columna empaquetada que comprende resina de afinidad de proteína A GE Healthcare Mab Select™ se preparó y se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 10 mM; pH 8,0.

20 Una alícuota de una proteína que comprende un resto Fc se muestreó directamente desde un lisado. La mezcla de proteína se cargó hasta aproximadamente 0,02 milímoles de proteína total/l de resina a un tiempo de residencia de 6-10 minutos. Véase la Figura 1, que correlaciona la proteína unida y la proteína cargada en función del tiempo de residencia.

25 Tras la carga, la columna se lavó con Tris 10 mM; pH 8,0, para 5 CV a hasta 220 cm/h. La proteína de interés se recuperó de la resina mediante elución con acetato de sodio 50 mM, pH 3,1 a hasta 220 cm/h. El conjunto de elución proporcionó más del 90% de recuperación del material soluble en el caldo celular inicial. La proteína recogida en el conjunto de elución se almacenó a 2-8°C hasta que se llevó a cabo la siguiente etapa de purificación.

Tras la separación, el medio de resina se limpió *in situ* haciendo fluir 5 CV de guanidina 6 M, pH 8,0 a 220 cm/h.

30 Los resultados de esta separación demostraron que una proteína soluble expresada en un sistema no de mamífero puede capturarse y purificarse, con alto rendimiento, directamente de caldo de lisado celular sin tener que replegar la proteína antes de la aplicación a una matriz de separación.

Ejemplo 2

35 Captura de una proteína que contiene Fc expresada en una forma de solubilidad limitada a partir de una mezcla de replegamiento usando cromatografía de afinidad de proteína A

40 Los siguientes experimentos demuestran que una proteína que contiene Fc puede separarse de una mezcla de replegamiento que comprende glicerol, guanidina, urea y arginina usando medios de afinidad de proteína A.

45 En un experimento, una proteína recombinante que comprende un péptido biológicamente activo ligado al extremo C-terminal del resto Fc de una molécula de IgG1 por medio de un ligador y que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa y que comprende 8 enlaces disulfuro, en un sistema de expresión no de mamífero, concretamente *E. coli*, se recolectó, replegó en condiciones apropiadas y se capturó usando medios de afinidad de proteína A.

50 El medio de crecimiento en el que estaban creciendo las células se centrífugó y la fracción líquida se eliminó, dejando las células como una pasta. Las células se resuspendieron en agua hasta aproximadamente el 60% del volumen original. Las células se lisaron por medio de tres pasos a través de un homogeneizador de alta presión.

55 60 Despues de haber lisado las células, el lisado se centrífugó en una centrífuga de pila de discos para recoger la proteína en la fracción sólida, que se expresó en una forma no nativa de solubilidad limitada, concretamente como cuerpos de inclusión.

65 La suspensión espesa de proteína se lavó múltiples veces resuspendiendo la suspensión espesa en agua hasta entre el 50 y el 80% del volumen de caldo de fermentación original, se mezcló y se centrífugó para recoger la proteína en la fracción sólida.

60 La proteína concentrada se combinó entonces en una disolución de solubilización que contenía la proteína, guanidina, urea y DTT.

Tras la incubación durante una hora, la disolución de proteína se diluyó en un tampón de replegamiento que contenía niveles apropiados de arginina, urea, glicerol, cisteína y cistamina.

En una operación independiente, una columna empaquetada que comprende resina de afinidad de proteína A ProSep VA Ultra™ con dimensiones de 1,1 cm de diámetro interno y ~25 cm de altura, se preparó y se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar.

5 Una alícuota de una proteína que comprende un resto Fc de la disolución de replegamiento se filtró a través de una serie de filtro de profundidad y/o de membrana para eliminar partículas. La mezcla de proteína acondicionada y filtrada se cargó hasta aproximadamente 0,35 milímoles de proteína total/l de resina a un tiempo de residencia de 6-10 minutos. Véase la Figura 1, que correlaciona la proteína unida y la proteína cargada en función del tiempo de residencia.

10 Tras la carga, la columna se lavó con Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar, para 4,5 CV a hasta 400 cm/h. La proteína que contiene Fc se recuperó de la resina mediante elución con acetato de sodio 100 mM, pH 3,7 a hasta 300 cm/h. El nivel promedio de pureza conseguido se muestra en la Figura 3.

15 Tras la separación, el medio de resina se limpió *in situ* haciendo fluir 5 CV de ácido fosfórico 150 mM. La columna se regeneró con 5 CV de Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M y DTT 50 mM; pH 7,4, se lavó con agua y entonces se lavó con 3 CV de ácido fosfórico 150 mM.

20 Los resultados de esta separación demuestran que una proteína insoluble expresada en un sistema no de mamífero puede purificarse directamente de un tampón de replegamiento sin tener que diluir el tampón de replegamiento antes de la aplicación a una matriz de separación durante más de 150 ciclos, tal como se indica mediante la tabla presentada en la Figura 3.

25 En otra separación, la columna de proteína A se hizo funcionar en ciclos con el procedimiento anterior 8-10 veces y entonces el ciclo final se ejecutó tal como sigue: el medio se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar. Una alícuota de proteína muestreada directamente de un tampón de replegamiento se filtró a través de una serie de filtro de profundidad y/o de membrana para eliminar partículas. La mezcla de proteína acondicionada y filtrada se cargó entonces en la columna hasta 0,35 milímoles de proteína total/l de resina a un tiempo de residencia de 6-10 minutos. Véase la Figura 1, que correlaciona la proteína unida y la proteína cargada en función del tiempo de residencia.

30 Tras la carga, la columna se lavó con Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar, para 4,5 CV a hasta 400 cm/h. La proteína de interés se recuperó de la resina eluyendo con acetato de sodio 100 mM, pH 3,7 a hasta 300 cm/h. El medio de resina se limpió *in situ* haciendo fluir 5 CV de ácido fosfórico 150 mM a través del mismo. Finalmente, la columna se lavó con agua, se regeneró con 5 CV de Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M y DTT 50 mM; pH 7,4, se lavó con agua y entonces se lavó con 3 CV de ácido fosfórico 150 mM. El análisis posterior de la resina mostró que no había sobrante de proteína entre ciclos, demostrando la capacidad de reutilizar la resina después de ambos métodos de limpieza.

40 Ejemplo 3

Separación de una proteína que contiene Fc de una mezcla de replegamiento usando cromatografía de intercambio catiónico (no parte de la invención)

45 Los siguientes experimentos demuestran que una proteína que contiene Fc puede separarse de una mezcla de replegamiento que comprende glicerol, guanidina, urea y arginina usando medios de intercambio catiónico.

50 En un experimento, una proteína recombinante que comprende un péptido biológicamente activo ligado al extremo C-terminal del resto Fc de una molécula de IgG1 por medio de un ligador y que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa y que comprende 8 enlaces disulfuro, se expresó en un sistema de expresión no de mamífero, concretamente *E. coli*, se recolectó, replegó en condiciones apropiadas y se capturó usando medios de intercambio catiónico.

55 El medio de crecimiento en el que estaban creciendo las células se centrifugó y la fracción líquida se eliminó, dejando las células como una pasta. Las células se resuspendieron en agua. Las células se lisaron por medio de múltiples pases a través de un homogeneizador de alta presión. Después de haber lisado las células, el lisado se centrifugó para recoger la proteína, que se expresó en una forma no nativa de solubilidad limitada, concretamente como cuerpos de inclusión. La suspensión espesa de proteína se lavó múltiples veces resuspendiendo la suspensión espesa en agua, se mezcló y se centrifugó para recoger la proteína. La proteína concentrada se transfirió entonces a un tampón de solubilización que contenía guanidina y DTT. Tras la incubación durante una hora, la disolución de proteína se diluyó en un tampón de replegamiento que contenía niveles apropiados de arginina, urea, glicerol, cisteína y cistamina.

60 En una operación independiente, una columna empaquetada que comprende resina de intercambio catiónico EMD Fractogel SO₃⁻ con dimensiones de 1,1 cm de diámetro interno y 20 cm de altura, se preparó y se equilibró con 5 volúmenes de columna de MES 30 mM; disolución tamponada a pH 4,5.

Una alícuota de una proteína que comprende un resto Fc se muestreó directamente de una disolución de replegamiento, se diluyó 3 veces con agua, se tituló con el 50% de ácido clorhídrico hasta ~pH 4,5 y se filtró a través de una serie de filtro de profundidad y/o membrana para eliminar partículas. La mezcla de proteína acondicionada y filtrada se cargó hasta aproximadamente 0,96 milímoles de proteína total/l de resina a 60 cm/h.

5 Tras la carga, la columna se lavó con MES 30 mM; pH 4,5, para 3 CV a 60 cm/h, entonces se lavó con 3 CV adicionales de MES 30 mM; pH 6,0. La proteína de interés se recuperó de la resina mediante elución en gradiente a través de 25 CV entre MES 30 mM; pH 6,0 y MES 30 mM; NaCl 500 mM; pH 6,0 a 60 cm/h. La proteína recogida en el conjunto de elución se almacenó a 2-8°C hasta que se llevó a cabo la siguiente etapa de purificación.

10 Los niveles de pureza conseguidos, tal como se determina mediante SEC y RP-HPLC, se muestran en la Figura 5.

15 Tras la separación, el medio de resina se limpió *in situ* haciendo fluir 3 CV de hidróxido de sodio 1 M, a 120 cm/h y se mantuvo durante 60 minutos antes de un lavado de 3 CV adicional con hidróxido de sodio 1 M.

20 Los resultados de esta separación demuestran que una proteína insoluble expresada en un sistema no de mamífero puede capturarse y purificarse desde un tampón de replegamiento con una variedad de matrices de separación, incluyendo una matriz de separación de intercambio iónico.

25 **Ejemplo 4**

Capacidad de reutilización de resina de afinidad de proteína A usada para aislar una proteína que contiene Fc directamente desde un tampón de replegamiento mediante cromatografía de afinidad

25 En otro aspecto del método, una gama de métodos de limpieza de columna puede emplearse junto con los métodos descritos en el presente documento, permitiendo que las resinas de cromatografía se reutilicen en una medida que hacen que el método sea económicamente factible. Tal como se describe en los ejemplos 2 y 3 para el caso de resinas de afinidad de proteína A, se han desarrollado protocolos de limpieza y han demostrado eliminar el producto 30 y contaminantes no de producto de la resina para permitir su reutilización. Los agentes de limpieza incluyen sustancias cáusticas (por ejemplo, hidróxido de sodio o potasio), detergentes (por ejemplo, SDS o Triton X-100), desnaturizantes (por ejemplo, urea o derivados de guanidina) y reductores (por ejemplo, DTT o tioglicolatos). Estos agentes pueden usarse en combinación o solos.

35 Con el fin de demostrar la capacidad de reutilización de resinas de columna tras la aplicación de los métodos de captura directa descritos, una alícuota de proteína que contiene Fc de pH ajustado y filtrada se cargó en resina nueva, sin usar, y resina que se había hecho funcionar en ciclos previamente 94 veces para evaluar la limpieza de la resina de proteína A y el efecto sobre la unión y separación de purificación de una proteína que contiene Fc con respecto al historial de resina.

40 40 El medio se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar. Una alícuota de proteína muestreada directamente de un tampón de replegamiento se filtró a través de una serie de filtro de profundidad y/o de membrana para eliminar partículas. La mezcla de proteína acondicionada y filtrada se cargó entonces en la columna hasta aproximadamente 0,35 milímoles de proteína 45 total/ml de resina a un tiempo de residencia de 6-10 minutos. Véase la Figura 1, que correlaciona la proteína unida y la proteína cargada en función del tiempo de residencia.

50 Tras la carga, la columna se lavó con Tris 25 mM, cloruro de sodio 100 mM; pH 7,4, o disolución tamponada similar, para 4,5 CV a hasta 400 cm/h. La proteína de interés se recuperó de la resina eluyendo con acetato de sodio 100 mM, pH 3,7 a hasta 300 cm/h. Cada columna se regeneró usando 5 CV de ácido fosfórico y 5 CV de una disolución tamponada ácida que contenía Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M y DTT 50 mM; pH 7,4.

55 Este procedimiento se repitió durante más de 100 ciclos. Muestras seleccionadas de este estudio de reutilización se sometieron a análisis de SEC-HPLC. El objetivo era hacer un seguimiento del % MP de pureza, % HMW y % de especies diméricas de los conjuntos así como entender el cambio de nivel de pureza desde la carga. No se observaron diferencias importantes entre las columnas usadas y las columnas nuevas.

60 Este ejemplo demuestra que no solo puede capturarse una proteína compleja de una disolución química compleja, sino que la resina puede hacerse funcionar en ciclos repetidamente y limpiarse y reutilizarse de manera reproducible a lo largo de un número de ciclos industrialmente relevantes.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de purificación de una proteína expresada en una forma de solubilidad limitada no nativa en un sistema de expresión no de mamífero que comprende:
- 5 (a) expresar una proteína en una forma de solubilidad limitada no nativa en una célula no de mamífero;
- (b) lisar una célula no de mamífero;
- 10 (c) solubilizar la proteína expresada en una disolución de solubilización que comprende uno o más de los siguientes:
- (i) un desnaturalizante; y
- 15 (ii) un reductor.
- (d) formar una disolución de replegamiento que comprende la disolución de solubilización y un tampón de replegamiento, comprendiendo el tampón de replegamiento uno o más de los siguientes:
- 20 (i) un desnaturalizante;
- (ii) un supresor de la agregación;
- (iii) un estabilizador de proteína; y
- 25 (iv) un componente redox;
- (e) aplicar directamente la disolución de replegamiento a una matriz de separación en condiciones adecuadas para que la proteína se asocie con la matriz;
- 30 (f) lavar la matriz de separación; y
- (g) eluir la proteína de la matriz de separación;
- 35 en el que la matriz de separación es una resina de afinidad seleccionada del grupo que consiste en resina de proteína A, de proteína G y de afinidad mimética sintética, y en el que la forma de solubilidad limitada no nativa es una forma en la que la proteína carece de al menos una característica estructural formada encontrada en una forma de la proteína que (a) es biológicamente activa en un ensayo *in vivo* o *in vitro* apropiado diseñado para evaluar la actividad biológica de la proteína y/o (b) forma agregados que requieren tratamiento para volverse solubles,
- 40 en el que tras la etapa g) no se lleva a cabo ninguna otra etapa de purificación.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína compleja.
- 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el sistema de expresión no de mamífero es células bacterianas o de levadura.
- 45 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el desnaturalizante comprende una o más de urea, sales de guanidinio, dimetilurea, metilurea y etilurea.
- 50 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el reductor comprende uno o más de cisteína, DTT, beta-mercaptopropano y glutatión.
- 55 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tensioactivo comprende uno o más de sarcosílo y dodecilsulfato de sodio.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el supresor de la agregación se selecciona del grupo que consiste en arginina, prolina, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, trehalosa, polisorbato-20, CHAPS, Triton X-100, dodecilmaltósido, Tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos.
- 60 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el estabilizador de proteína comprende uno o más de arginina, prolina, polietilenglicoles, α -ciclodextrina, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, alcoholes polihidroxilados, glicerol, sacarosa, sorbitol, glucosa, Tris, sulfato de sodio, sulfato de potasio y osmolitos.
- 65 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el componente redox comprende uno o más de glutatión reducido, glutatión oxidado, cisteína, cistina, cisteamina, cistamina y beta-mercaptopropano.

- 10.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la forma de solubilidad limitada no nativa es un componente de un cuerpo de inclusión.
- 5 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además las etapas de
(h) lavar la matriz de separación con un reactivo de regeneración; y
(i) regenerar la matriz de separación.
- 10 12.- El método según la reivindicación 11, en el que la regeneración comprende
(i) lavar la matriz de separación con una disolución que comprende uno o ambos de un caótropo presente a una concentración de 4-6 M y un reductor;
- 15 o
(ii) lavar la matriz de separación con una disolución que comprende Tris 50 mM, citrato 10 mM, urea 6 M, DTT 50 mM a pH 7,4.
- 20 13.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la disolución de solubilización comprende guanidina 4-6 M y DTT 50 mM.
- 25 14.- El método según la reivindicación 11, en el que la matriz de separación es una resina de afinidad de proteína A que se lava con 5 volúmenes de columna de 150 mM de ácido fosfórico mantenido durante más de 15 minutos a través de la columna.
- 30 15.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la resina de afinidad mimética sintética es una resina MEP Hyper-Cel.
- 35 16.- El método según la reivindicación 2, en el que la proteína compleja se selecciona del grupo que consiste en una proteína multimérica, un anticuerpo, un pepticuerpo y una proteína de fusión Fc.
- 40 17.- El método según la reivindicación 11, en el que el reactivo de regeneración es uno de una base fuerte o un ácido fuerte.
- 45 18.- El método según la reivindicación 17, en el que el ácido fuerte es ácido fosfórico y la base fuerte es hidróxido de sodio.
- 40 19.- El método según la reivindicación 12, en el que el caótropo es uno de urea, dimetilurea, metilurea, etilurea y guanidinio, y/o en el que el reductor es uno de cisteína, DTT, beta-mercaptopropano y glutatión.
- 20.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el sistema de expresión no de mamífero es bacterias.

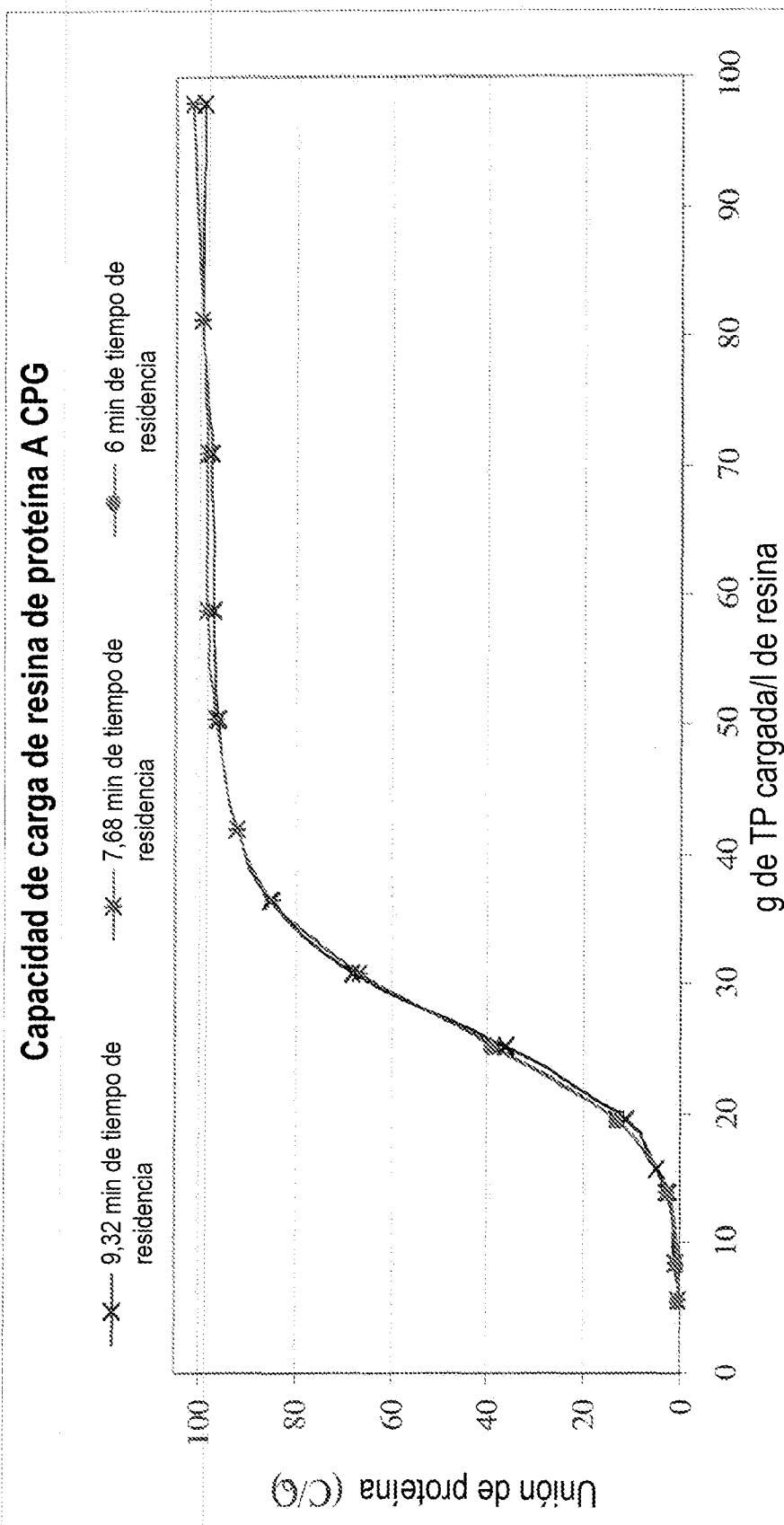


Figura 1

		Pureza promedio					
		Pureza de pico principal de RP-HPLC (%)	Pureza de pico principal de SE-HPLC (%)	Pureza de pico principal de CE-SDS (%)	Nivel de proteinas huésped (ppm)	Nivel de ADN (pg/mg de proteína)	Rendimiento promedio (%)
Carga	Promedio (n=13) Desv. est. (n=13)	34,5 2,4	74,5 2,7	79,2 4,4	9100,0 424,3	>70000 *	— —
Conjunto purificado	Promedio (n=17) Desv. est. (n=17)	41,3 1,5	68,8 3,8	84,7 4,0	41,0 5,7	215,2 301,2	81,7 12,3

* Datos limitados a N=1

Figura 2

		Pureza promedio				
		Pureza de pico principal de RP-HPLC (%)	Pureza de pico principal de SE-HPLC (%)	Pureza de pico principal de CE-SDS (%)	Nivel de proteína huésped (ppm)	Nivel de ADN (pg/mg de proteína)
Carga	Promedio (n=5) Desv. est. (n=5)	36,0 0,9	76,1 1,9	75,5 1,5	1400,0 *	>70000 *
Conjunto purificado	Promedio (150 ciclos) Desv. est. (150 ciclos)	40,2 2,5	75,0 8,7	82,4 4,6	71,4 23,0	89,2 175,0

* Datos limitados a N=1

Figura 3

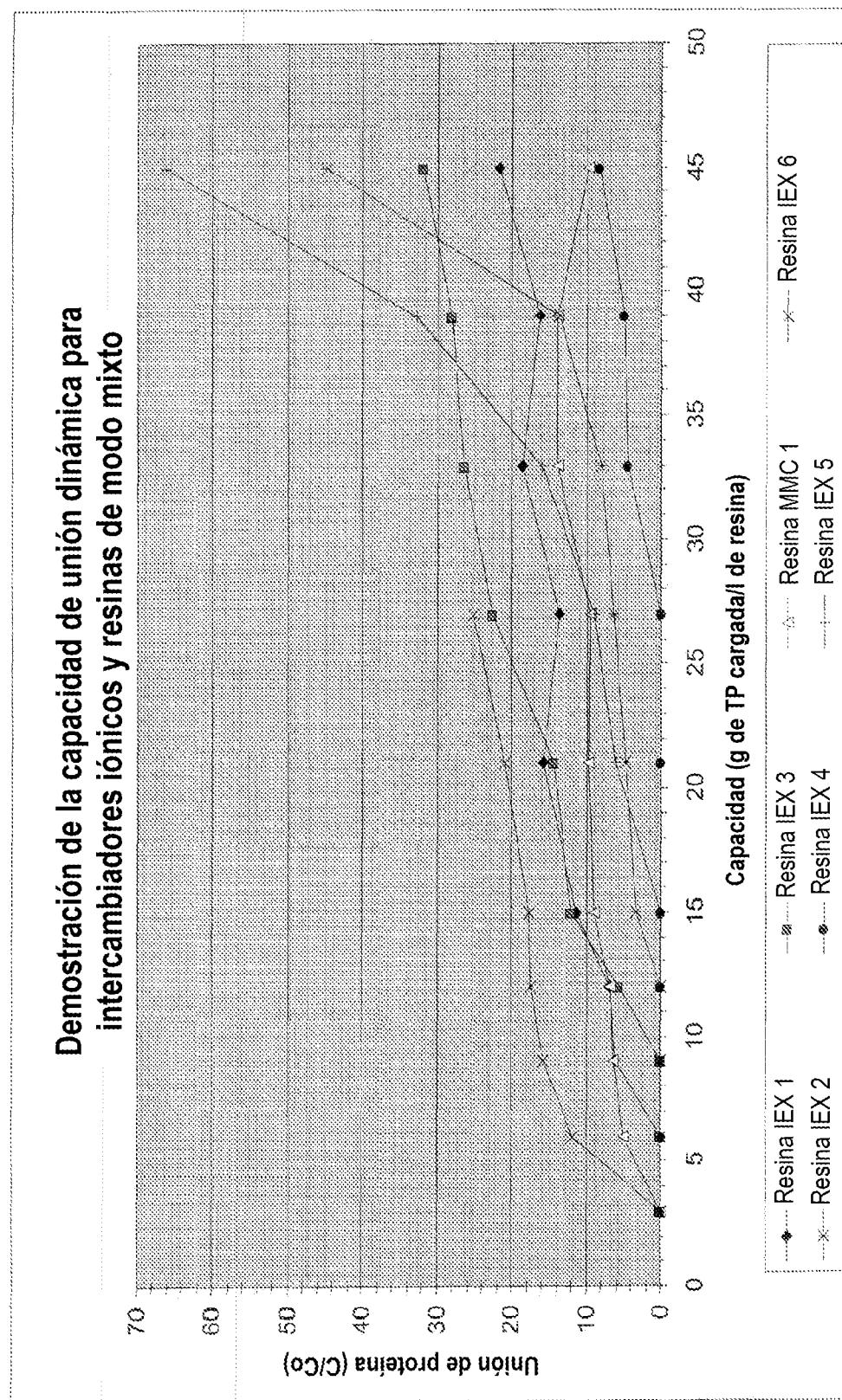


Figura 4

	Pureza del pico principal de RP-HPLC (%)	Pureza del pico principal de SE-HPLC (%)	Rendimiento promedio (%)
Carga	29,8	64,6	~
CEX	46,0	80,3	62,0
AEX	30,9	75,7	85,0

Figura 5