



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 367**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05756895 .8**

96 Fecha de presentación : **27.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1761552**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de proteína de unión al IL-18.**

30 Prioridad: **29.06.2004 EP 04103047**
12.07.2004 US 587296 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **ARES TRADING S.A.**
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es: **Kornmann, Henri y**
Baer, Gianni

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de proteína de unión a IL-18.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está en el campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, se refiere a una etapa para la purificación de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) de un fluido usando reparto de dos fases acuosas.

10 **Fundamento de la invención**

Las proteínas se han hecho importantes comercialmente como fármacos que se denominan también generalmente “biológicos”. Uno de los mayores retos es el desarrollo de procedimientos de coste eficaz, y eficientes, para purificar proteínas a escala comercial. Aunque se dispone ahora de muchos métodos para preparación a gran escala de proteínas, 15 productos crudos, tales como fluidos corporales o cosechas de células, contienen no sólo el producto deseado sino también impurezas, que son difíciles de separar del producto deseado. Además, las fuentes biológicas de proteínas contienen usualmente mezclas complejas de materiales.

Las fuentes biológicas tales como medio acondicionado de cultivo de células, de células que expresan un producto 20 proteínico deseado pueden contener menos impurezas, en particular si se hacen crecer las células en medio exento de suero. Sin embargo, las autoridades sanitarias piden altos estándares de pureza para proteínas destinadas a administración humana. Además, muchos métodos de purificación pueden contener etapas que requieran aplicación de pH bajo o alto, altas concentraciones de sal u otras condiciones extremas que puedan comprometer a la actividad biológica de una proteína dada. Así, para cualquier proteína, es un reto establecer un procedimiento de purificación eficaz que 25 permita suficiente pureza conservando al tiempo la actividad biológica de la proteína.

La purificación de proteínas comprende generalmente al menos tres fases o etapas, a saber, una etapa de captura, en la que la proteína deseada se separa de otros componentes presentes en el fluido tal como ADN o ARN, produciendo también idealmente una purificación preliminar, una etapa intermedia, en la que se aíslan proteínas de contaminantes 30 de tamaño y/o propiedades físicas/químicas similares, y finalmente una etapa de afinado que produce el alto nivel de pureza que se requiere, por ejemplo, en proteínas destinadas a administración terapéutica en seres humanos o animales.

Típicamente, las etapas de purificación de proteínas se basan en separación cromatográfica de los compuestos presentes en un fluido dado. Son métodos cromatográficos aplicados ampliamente, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad o cromatografía 35 de fase inversa.

Los sistemas de dos fases acuosas (A2PS) son una alternativa a los procedimientos cromatográficos clásicos. Se han usado en la técnica anterior procedimientos de A2PS para la purificación de proteínas (véase Tabla 1). 40

TABLA 1

Proteínas purificadas en A2PS

Proteína	Fuente	P.M. (kDa)	PI	Rendimiento (%)	Factor de purificación	Referencias
Xilanasa	<i>Bacillus pumilus</i>	39	5,28	41	57	(Duarte et al., 2003)
β-glucosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	91	4,69	85	2	(Johansson & Reczey, 1998)
Lipasa	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	35	6,29	68	41	(Bompensieri et al., 1998)
Glucoamilasa	-	52	4,68	96	3	(Minami & Kilikian, 1997)
BSA	Bovino	10	5,85	95	-	(Bleier et al., 2001)
Cutinasa	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	24	6,82	95	5	(Costa et al., 2000)
GFP	<i>Escherishia coli</i>	27	5,67	91	3,3	(Li & Beitle, 2002)
Lisozima	Clara de huevo de pollo	2	8,00	95	2,2	(Balasubramaniam et al., 2003)

La purificación de interferón-beta (IFN- β) de un medio de producción que contenía un suero parcialmente purificado produjo una muestra de IFN- β purificada 350 veces y concentrada hasta 10 veces con una actividad específica de 3-7,10E10⁶ UI/mg (Menge *et al.*, 1987). Sin embargo, la aplicación de A2PS para la purificación de proteínas terapéuticas a escala industrial está limitada todavía.

El A2PS se basa en el reparto de la molécula objetivo entre dos fases acuosas inmiscibles (por ejemplo, un sistema de PEG/sal). Este sistema está adaptado para extracción de proteínas porque el alto contenido de agua de ambas fases (70-80% p/p) significa alta biocompatibilidad y baja tensión interfacial que minimiza la degradación de la proteína. Es un ejemplo del principio de purificación de proteínas por A2PS la purificación del factor de crecimiento tipo insulina IGF-1 en el documento US 5.695.958.

La elección de un sistema de fases adecuado (polímero/polímero; polímero/sal...) es la etapa clave en un procedimiento de purificación basado en A2PS. Este sistema debe mostrar una alta distribución selectiva de la proteína objetivo entre las fases. En la Tabla 2 se ilustran ejemplos de parejas usadas para purificación por A2PS de proteínas de diversas fuentes biológicas.

La composición de sistemas de dos fases de polímeros acuosos se representa habitualmente en forma rectangular de un diagrama de fases, como se ilustra en la Fig. 5, tomado de Hatti-Kaul, 2000. El eje vertical se usa comúnmente para el componente, que está enriquecido en la fase superior. Se mezclan cantidades de polímero/sal X, polímero/sal Y y S de agua. La composición total de una mezcla está representada por uno de los puntos A1, A2 o A3 del diagrama de fases. Las mezclas se separan en dos fases. Las composiciones de estas dos fases están representadas por los puntos T y B, que se denominan nodos y están situados en la línea binodal. La curva binodal es la línea que separa dos dominios de composiciones: uno en el que el sistema es monofásico (izquierda y parte inferior de la curva) y uno en el que puede observarse la separación de fases (parte superior y derecha de la curva). La línea que une los puntos B y T que representan las composiciones de las fases coexistentes se denomina una línea de conexión. Los puntos A1, A2 o A3, que representan la mezcla total, deben estar situados en la misma línea de conexión que el nodo B y T que caracterizan las composiciones de las fases coexistentes originadas de estas mezclas.

Como se muestra en la Fig. 5, mezclas de diferentes composiciones totales representadas por diferentes puntos en la misma línea de conexión dan lugar a sistemas de dos fases con composiciones idénticas pero diferentes volúmenes de las fases coexistentes. La relación en volumen de las dos fases puede aproximarse gráficamente por la relación del segmento AB (fase superior) y AT (fase inferior).

TABLA 2

Ejemplos de extracción de proteínas basada en A2PS

Referencia	Enzima o proteína	Sistema usado	Origen
(Menge et al., 1984) documento DE 2943026	Interferón	PEG-dextrano	materia prima
(Schütte et al., 1984)	D-Lactato deshidrogenasa	PEG-fosfato	Lactobacillus cellubiosus
(Kim et al., 1985) documento US 4.508.825	Proteasa, amilasa	PEG-dextrano	Aspergillus orizae
(Schütte et al., 1985)	L-Leucin deshidrogenasa	PEG-fosfato	Bacillus cereus
(Gustafsson et al., 1986) documento US 4.579.661	ADH, hexoquinasa	PEG-fosfato	Levadura

ES 2 313 367 T3

	(Gustaffson et al., 1986)	Transferrina	PEG-fosfato	Plasma sanguíneo
5	(Paul et al., 1986) documento US 4.591.563	Dextrano-sacarasa	PEG-dextrano	Leuconostoc mesenteroides
	(van Wijnendaele et al., 1991) documento EP 0199698	Antígeno de hepatitis B	PEG-sulfato amónico	Levadura
10	(van Wijnendale et al., 1991) documento EP 0199698	Alfa-1-antitripsina	PEG-sulfato amónico	Levadura
15	(Dove & Mitra, 1988) documento US 4.684.723	Albúmina, IgM, IgG, alfa-1-antitripsina	PEG-fosfato	Plasma sanguíneo
20	(Tjemeld & Johansson, 1987) documento US 6.454.950)	Lactato deshidrogenasa	PEG-PPT acuafase	Músculo de cerdo
25	(Ananthapadmanabhan & Goddard, 1988) documento US 4.743.550)	Proteasa alcalina	PEG-sulfato sódico	
	(Brewer et al., 1988) documento US 4.728.613	Proteasa	PEG-sulfato sódico	Abeja de fermentación completa
30	(Sieron et al., 1994) documento DD 288837	Proteínas recombinantes	PEG-poli(alcohol vinílico)	
35	(Enfors et al., 1992) documento WO 92/97868	IgG humana	PEG-fosfato	Staphylococcus
40	(Guiliano & Szlag, 1992) documento US 5.093.254	Alcohol deshidrogenasa (ADH)	PVP-maltodextrina	Levadura de panadero
	(Heinsohne et al., 1992) documento EP 0 477 284)	Quimosina	PEG-sulfato sódico	Aspergillus niger var awamori
45	(Kirchberger et al., 1992) documento DD 298424	Fosfatasa alcalina	PEG-dextrano	Intestino de becerro
50	(Dos Reis Coimbra et al., 1994)	Beta-lactoglobulina	PEG-fosfato	Suero de queso
	(Dos Reis Coimbra et al., 1994)	Alfa-lactoglobulina	PEG-fosfato	Suero de queso
55	(Cordes & Kula, 1994)	Formiato deshidrogenasa	PEG-fosfato	Candida blodinii
	(Hart et al., 1994)	IGF	PEG-sulfato sódico	E. coli

ES 2 313 367 T3

(Lorch et al., 1994) documento US 5.328.841	EG	PEG-sulfato amónico	Mezcla de celulasa
(Builder et al., 1995) documento US 5.407.819	IGF-1 o polipéptido de mamífero	PEG-citrato	E. coli
(Heinsohne & Hayenga, 1995) documento EP 0 477 284)	Quimosina	PEG-sulfato sódico	Estómago de bovino
(Lee & Khan, 1995) documento US 5.407.579	Hemoglobina	PEG-fosfato	Sangre de bovino
(Braunstein et al., 1995) documento WO 96/23061	Diferentes lipasas y proteasas	Detergentes	Diferentes organismos
(Guinn, 1997) documento US 5.907.035	Hemoglobina recombinante	PEG-sulfato magnésico	E. coli
(Hayenga et al., 1999) documento US 6.437.101	Hormona del crecimiento humano	PEG-sulfato amónico	E. coli
(Tjemeld et al., 2002) documento US 6.454.950	BSA	HM-EOPO-agua	Plasma sanguíneo
(Ageland et al., 2003) documento US 6.559.284	Apolipoproteína A y E	EO sub 30 PO-Reppal PES	E. coli

Sin embargo, el mecanismo que gobierna el reparto de materiales biológicos no se comprende bien todavía. Depende de muchos factores listados en la siguiente Tabla 3. Los más usados comúnmente en la práctica actual son la concentración y el peso molecular de polímeros formadores de fase, el tipo y cantidad de la sal y el tipo y concentración de aditivos (usualmente sales inorgánicas). Estos factores se consideran generalmente como los más importantes para manipular el reparto de proteína a fin de conseguir una separación mejor. Por tanto, es extremadamente difícil encontrar el sistema A2PS apropiado para una proteína dada a purificar de una fuente dada, también porque la proteína destinada a uso terapéutico debe permanecer totalmente funcional en términos de estructura (por ejemplo, sin agregación, truncamientos) y en términos de función.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Factores capaces de dirigir el reparto de soluto en sistemas de dos fases acuosas

5	Tipo de polímeros formadores de fases ^a
	Peso molecular de polímeros formadores de fases ^a
10	Concentraciones de polímeros formadores de fases ^a
	Tipo de aditivo ^b
15	Concentración de aditivo ^b
	Temperatura
	pH
20	Presencia de aditivos formadores de complejos ^c
	Modificación estructural ^d

^aEn sistemas de polímero-sal simples acuosos, el tipo y concentración de sal formadora de fase es el factor igual a los de polímero formador de fase en sistemas de dos polímeros. ^baditivo de bajo peso molecular, tal como sales inorgánicas, urea, etc., sin afinidad específica por el soluto. ^cligandos de afinidad, tales como fármacos, colorantes de triazina, acomplejamientos orgánicos, ácidos grasos, etc. ^dmodificación por tratamiento químico, enzimático, etc. produciendo eliminación, incorporación o alteración de topografía de restos accesibles a disolvente en la molécula de soluto.

La proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) es una proteína soluble de origen natural que se purificó inicialmente por afinidad, en una columna de IL-18, a partir de orina (Novick *et al.*, 1999). La IL-18BP anula la inducción por IL-18 de IFN- γ y la activación por IL-18 de NF- κ B *in vitro*. Además, IL-18BP inhibe la inducción de IFN- γ en ratones inyectados con LPS.

El gen de IL-18BP se localizó en el cromosoma humano 11, y no podía encontrarse un exón que codificara un dominio transmembrana en la secuencia genómica de 8,3 kb que comprende el gen de IL-18BP. Se han identificado hasta ahora en seres humanos cuatro isoformas de IL-18BP generadas por empalme de mRNA alternativo. Se denominaron IL-18BP a, b, c y d, que comparten todas el mismo término N y difieren en el término C (Novick *et al.*, 1999). Estas isoformas varían en su capacidad para unirse a IL-18 (Kim *et al.*, 2000). De las cuatro isoformas de IL-18BP humana (hIL-18BP), se sabe que las isoformas a y c tienen capacidad neutralizante de IL-18. La isoforma de IL-18BP más abundante, la isoforma a, presenta una alta afinidad por IL-18, con una velocidad de entrada rápida y una velocidad de salida lenta, y una constante de disociación (kd) de aproximadamente 0,4 nM (Kim *et al.*, 2000). La IL-18BP se expresa constitutivamente en el bazo, y pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. Los residuos implicados en la interacción de IL-18 con IL-18BP se han descrito mediante el uso de modelación por ordenador (Kim *et al.*, 2000) y se basan en la interacción entre la proteína similar IL-1 β con la IL-1R tipo I (Vigers *et al.*, 1997).

La IL-18BP está presente constitutivamente en muchas células (Puren *et al.*, 1999) y circula en seres humanos sanos (Urushihara *et al.*, 2000), representando un fenómeno único en la biología de citoquinas. Debido a la alta afinidad de IL-18BP por IL-18 (kd = 0,4 nM) así como la alta concentración de IL-18BP encontrada en la circulación (un exceso molar de 20 veces sobre IL-18), se ha especulado con que muchas, si no todas, las moléculas de IL-18 en la circulación están unidas a IL-18BP. Así, la IL-18BP en circulación que compite con receptores de la superficie celular de IL-18 puede actuar como una molécula anti-inflamatoria e inmunosupresora natural.

Se ha sugerido IL-18BP como una proteína terapéutica en un cierto número de enfermedades y trastornos, tales como psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriática, lesión del hígado, sepsis, aterosclerosis, enfermedades cardíacas isquémicas, alergias, etc., véanse, por ejemplo, los documentos WO9909063, WO0107480, WO0162285, WO0185201, WO02060479, WO02096456, WO03080104, WO02092008, WO02101049 y WO03013577.

La técnica anterior no describe un procedimiento de purificación de IL-18BP.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de una etapa de purificación eficaz para proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) que se basa en un reparto en dos fases acuosas, en la que el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal que comprende $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ o Na_2SO_4 .

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la purificación de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) a partir de un fluido, que comprende al menos una etapa que comprende este sistema de dos fases acuosas.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de este sistema de dos fases acuosas para la purificación de IL-18BP de un fluido.

Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de los perfiles de Electroforesis de Zona Capilar (CZE) de indicaciones identificadas del modelo estadístico.

La Fig. 2 muestra la línea de conexión para condiciones Val2-1.

La Fig. 3 muestra la línea de conexión para condiciones Val2-2.

La Fig. 4 muestra la línea de conexión para condiciones Val2-5.

La Fig. 5 ilustra el principio de establecimiento de una línea de conexión en un sistema de dos fases acuosas (tomado de Hatti-Kaul, 2000).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de una etapa para el procedimiento de purificación de IL-18BP.

La invención se refiere a un procedimiento para purificar IL-18BP de un fluido que comprende al menos una etapa que usa reparto de dos fases acuosas, en la que el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal que comprende $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ o Na_2SO_4 . Tal sistema de dos fases acuosas puede usarse como una etapa simple de purificación de IL-18BP. Puede usarse también como una etapa entre otras etapas basadas en otros métodos de purificación. Puede usarse además en etapas múltiples del procedimiento de purificación, es decir, dos, tres o más etapas se basan en un reparto de dos fases acuosas. Si el procedimiento de purificación comprende más de una etapa basada en un sistema de dos fases acuosas, el sistema de dos fases acuosas individual usado puede ser el mismo sistema, o basarse en sistemas diferentes, por ejemplo, diferentes polímeros, sales o similares.

Según la presente invención, el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal.

El PEG a usar según el procedimiento de purificación de la invención puede tener cualquier peso molecular adecuado. En una realización preferida, el PEG tiene un peso molecular que varía entre alrededor de 2.000 y aproximadamente 12.000, puede ser aproximadamente 3.000, o aproximadamente 4.000, o aproximadamente 5.000, o aproximadamente 6.000, o aproximadamente 7.000, o aproximadamente 8.000, o aproximadamente 9.000, o aproximadamente 10.000, o aproximadamente 11.000. Se prefiere más que el PEG tenga un peso molecular de aproximadamente 10.000.

La fase de sal comprende $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$. Alternativamente, la fase de sal comprende $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$.

Las concentraciones del polímero en la fase de polímero pueden variar. En una realización preferida, la concentración inicial del polímero, preferiblemente PEG, es menos de aproximadamente 35% [p/p], menos de aproximadamente 30% [p/p], 29% [p/p], 28% [p/p], 27% [p/p], 26% [p/p], 25% [p/p], 24% [p/p], 23% [p/p], 22% [p/p], 21% [p/p], 20% [p/p], 19% [p/p], 18% [p/p], 17% [p/p], 16% [p/p], 15% [p/p], 14% [p/p], 13% [p/p], 12% [p/p], 11% [p/p], 10% [p/p], 9% [p/p], 8% [p/p], 7% [p/p], 6% [p/p], 5% [p/p], 4% [p/p], 3% [p/p], 2% [p/p] o 1% [p/p].

La concentración de la sal en la fase de sal también puede variar, en particular dependiendo de la concentración usada para la fase de polímero. En una realización preferida, se usa Na_2SO_4 en una concentración inferior a aproximadamente el 30% [p/p], 25% [p/p], 20% [p/p], 16% [p/p], 15% [p/p], 14% [p/p], 13% [p/p], 12% [p/p], 11% [p/p], 10% [p/p], 9% [p/p], 8% [p/p], 7% [p/p], 6% [p/p], 5% [p/p], 4% [p/p], 3% [p/p], 2% [p/p] o 1% [p/p].

En una realización de la invención altamente preferida, las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,5108 x + 35,159$$

ES 2 313 367 T3

en la que Y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

En una realización altamente preferida adicional, las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,5573 x + 35,757$$

en la que Y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

En una realización altamente preferida adicional todavía, las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,1182 x + 35,355$$

en la que Y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

Según la presente invención, el procedimiento se realiza en un intervalo de pH entre pH 4 y 9, puede realizarse a aproximadamente pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 o pH 9. Preferiblemente, se realiza a aproximadamente pH 5 o a aproximadamente pH 7.

El procedimiento según la invención puede realizarse a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo, a 4°C, 6,5°C, 13°C, 19,5°C, 30°C, pero preferiblemente el procedimiento se realiza a temperatura ambiente.

En una realización preferida, la etapa que usa un sistema de dos fases acuosas de la invención es una etapa de captura, es decir, una etapa inicial de un procedimiento de purificación que comprende una o más etapas adicionales.

La etapa de purificación de la invención puede separar > 10%, > 20%, > 30%, > 40%, > 50% o > 60%, o incluso > 70% de los contaminantes totales presentes en el material crudo. El rendimiento obtenible con la etapa de purificación de la invención puede ser > 50%, > 60%, > 70% o > 80%, o incluso > 90%.

En una realización preferida adicional, el procedimiento de la invención comprende además una o más etapas de purificación adicionales.

Preferiblemente, las etapas de purificación adicionales se seleccionan entre cromatografía de afinidad de ion de metal, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de fase inversa.

La cromatografía de inducción de carga hidrófoba se realiza preferiblemente en una resina que tenga como ligando inmovilizado 4-mercaptoetilpiridina (MEP). MEP-Hypercel® es una resina que es particularmente adecuada en el marco de la presente invención.

La etapa de cromatografía de intercambio iónico se realiza preferiblemente usando una resina de carboximetilo (CM).

La etapa de cromatografía de afinidad es preferiblemente cromatografía de afinidad de ion de metal inmovilizado, y sefarsa de quelación es un ejemplo de una resina que puede usarse para realizar esta etapa cromatográfica.

La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) puede realizarse en cualquier resina de HIC conocida, tal como una resina que tenga como ligando inmovilizado residuos de alquilo o arilo. Son ejemplos de tales resinas de HIC buti-, octil- o fenil-sefarsa (agarosa).

Un material preferido útil para la etapa de fase inversa es 30RPC de fuente de fase inversa.

En una realización altamente preferida, la etapa de purificación de la invención es seguida por las etapas de:

- Someter el fluido a cromatografía de afinidad de ion de metal inmovilizado;
- Someter el eluato de la cromatografía de afinidad de ion de metal a cromatografía de interacción de carga hidrófoba;
- Someter el eluato de la cromatografía de interacción de carga hidrófoba a cromatografía de intercambio iónico;
- Someter el flujo a través de la cromatografía de intercambio iónico a cromatografía de interacción hidrófoba;
- Someter el eluato de la cromatografía de interacción hidrófoba a cromatografía de fase inversa.

El fluido se somete preferiblemente a ultrafiltración o dafiltración antes de la etapa (a).

Aunque se prefiere el orden de las etapas anteriores (a) a (e), las etapas del procedimiento de la invención pueden realizarse en cualquier orden que conduzca a un producto proteínico purificado.

La etapa (a) se realiza preferiblemente en una columna de sefarosa de quelación, tal como una columna de flujo rápido de sefarosa de quelación, que tenga iones Zn^{2+} quelados. Preferiblemente, la unión de IL-18BP se realiza a pH $8,5 \pm 0,1$, preferiblemente en fosfato sódico 50 mM y NaCl 0,5 M que tengan este pH. La elución se realiza preferiblemente a pH $9,0 \pm 0,1$, por ejemplo, en acetato amónico 0,075 M que tenga este pH.

La etapa (b) se realiza preferiblemente en una columna de MEP (derivado de 4-mercaptoetilpiridina), tal como MEP HyperCel® (LifeSciences). La unión de IL-18BP se realiza preferiblemente a pH $6,1 \pm 0,1$, por ejemplo, en PBS 1X + 1 NaCl que tenga este pH. La elución se realiza preferiblemente a pH $8,4 \pm 0,1$, por ejemplo, con tampón fosfato 20 mM más propilenglicol del 35%, teniendo la mezcla pH $8,4 \pm 0,1$.

La etapa (c) se realiza preferiblemente en una columna de carboximetilsefarosa (CM). Ésta es una etapa en la que se recoge el flujo a través para purificación adicional. Esta etapa se basa en el hecho de que, en circunstancias específicas relativas, por ejemplo, a condiciones de sal y pH, la IL-18BP no se une a la resina, mientras las impurezas se unen. Preferiblemente, la etapa (c) se realiza a pH $6,0 \pm 0,2$, por ejemplo en presencia de MES (ácido N-morfolinoetanosulfónico) 1 mM.

La etapa (d) se realiza preferiblemente en una columna de fenilsefarosa, tal como una columna Phenyl-Sepharose Fast Flow. Preferiblemente, la unión de IL-18BP se realiza a aproximadamente pH $9,1 \pm 0,2$, por ejemplo, en borato sódico 50 mM y sulfato amónico 0,9 M que tenga este pH. La elución de la columna de fenilsefarosa se realiza preferiblemente a pH $9,1 \pm 0,2$ en presencia de una concentración de sal elevada, tal como en borato sódico 50 mM $9,1 \pm 0,2$, sulfato amónico 0,15 M que tenga este pH.

La etapa (e) se realiza preferiblemente en una columna Source 30 RPC. La unión de IL-18BP al material de la columna se realiza preferiblemente a pH $9,1 \pm 0,2$, por ejemplo, en tampón de borato sódico 50 mM. La elución se realiza preferiblemente usando un gradiente, eluyendo IL-18BP alrededor del 28-32% de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en acetonitrilo.

Se entiende que las condiciones descritas antes en relación con las etapas (a) a (e) de la purificación pueden aplicarse también cuando se realizan etapas simples de la invención, o (sub)combinaciones de etapas.

En una realización preferida adicional del presente procedimiento de purificación, se efectúan una o más etapas de ultrafiltración. La ultrafiltración es útil, por ejemplo, para la concentración de la proteína objetivo, para intercambio de tampón, o para la separación de componentes de pequeño peso molecular en los eluatos resultantes de etapas cromatográficas previas. Esta ultrafiltración permite separar disolvente orgánico, TFA y sales de la etapa previa, para equilibrar la IL-18BP en el tampón en volumen y concentrar la molécula a la concentración deseada. Tal ultrafiltración puede efectuarse, por ejemplo, en medios de ultrafiltración que excluyan componentes que tengan pesos moleculares por debajo de 5 kDa.

Preferiblemente, la ultrafiltración se realiza entre las etapas (b) y (c), y/o después de la etapa (e). Más preferiblemente, se realizan dos etapas de ultrafiltración, una entre las etapas (b) y (c) y otra después de la etapa (e).

Con el fin de facilitar el almacenamiento o transporte, por ejemplo, el material puede congelarse y descongelarse antes y/o después de cualquier etapa de purificación de la invención.

Si la proteína purificada según el procedimiento de la invención se pretende para administración a seres humanos, es ventajoso incluir además etapas de separación de virus. Preferiblemente, se realiza una etapa de filtración para separación de virus entre las etapas (d) y (e). Se prefiere además realizar una etapa de filtración para separación de virus después de la etapa (e). Más preferiblemente, el procedimiento comprende dos etapas de separación de virus, una de las cuales se realiza entre las etapas (d) y (e), y otra de las cuales se realiza después de la etapa (e).

El fluido del que se purifica IL-18BP según la presente invención se selecciona preferiblemente entre cosecha de cultivo de células, lisado de células, extracto de células, extracto de tejidos, plasma sanguíneo, suero, leche, orina, ascites, extracto de plantas o una fracción derivada de una etapa de purificación de proteína anterior.

El fluido puede ser cosecha de cultivo de células crudo no clarificado o cosecha de cultivo de células crudo clarificado, y se deriva preferiblemente de células de Ovario de Hámster Chino (CHO). Cosecha de cultivo de células crudo clarificado se refiere a un medio acondicionado de cultivo de células del que se han separado células y residuos, por ejemplo, por técnicas de centrifugación o filtración. Si se usa cosecha de cultivo de células crudo no clarificado como material de partida para el procedimiento de la invención, están presentes células y residuos. Como se muestra en el ejemplo siguiente, la etapa de purificación de la invención es capaz de capturar IL-18BP incluso a partir de cosecha de cultivo de células crudo no clarificado que no se ha pretratado.

Las células CHO que producen IL-18BP pueden desarrollarse en suspensión, o incorporarse a una superficie de un portador tal como, por ejemplo, un microportador. Preferiblemente, las células se desarrollan en suspensión.

Según la presente invención, la IL-18BP a purificar puede ser nativa, es decir, IL-18BP de origen natural. Puede purificarse así de cualquier fuente o material natural, tal como, por ejemplo, de fluidos corporales tales como orina.

La IL-18BP puede derivarse también de cualquier fuente animal o humana. Preferiblemente, la IL-18BP a purificar es humana, y más preferiblemente es IL-18BP recombinante. La IL-18BP recombinante puede producirse en sistemas de expresión procariotas, tal como en sistemas bacterianos como *Escherichia coli*. Puede producirse también en sistemas de expresión eucariotas, tales como células de levadura, insectos o mamíferos. Según la presente invención, se prefiere expresar IL-18BP en células de mamíferos tales como linajes celulares de animales, o en linajes celulares humanos. Las células de ovario de hámster chino (CHO) son un ejemplo de un linaje celular que es particularmente adecuado para expresar IL-18BP.

Puesto que la IL-18BP es una proteína segregada soluble, se libera en el sobrenadante del cultivo de células, bien mediante su péptido señal natural o bien mediante un péptido señal heterólogo, es decir, un péptido señal derivado de otra proteína segregada, que puede ser más eficaz en el sistema de expresión particular usado. El fluido del que se purifica IL-18BP es así preferiblemente sobrenadante de cultivo de células, tal como, por ejemplo, sobrenadante de células CHO. Es más preferido purificar la proteína del sobrenadante de células que se desarrollaron en medio exento de suero, es decir, en medio de cultivo que no contiene suero derivado de becerro fetal u otras fuentes animales.

La expresión “proteína de unión a IL-18” se usa aquí de manera sinónima a “IL-18BP”. Esta expresión se refiere a proteínas de unión a IL-18 tales como las definidas en el documento WO 99/09063 o en Novick *et al.*, 1999. El término IL-18BP incluye variantes de empalme e/o isoformas de proteínas de unión a IL-18, como las definidas en Kim *et al.*, 2000, en particular isoformas humanas a y c de IL-18BP. El término “IL-18BP”, según se usa aquí, incluye además muteínas, derivados funcionales, fracciones activas, proteínas fusionadas, proteínas permutadas circularmente y costillas de IL-18BP como se definen en el documento WO 99/09063.

La IL-18BP sujeta al procedimiento de purificación según la presente invención puede ser glicosilada o no glicosilada, puede derivarse de fuentes naturales, tales como orina, o puede producirse de manera preferible recombinantemente. La expresión recombinante puede realizarse en sistemas de expresión procariotas como *E. coli*, o en sistemas de expresión eucariotas, y preferiblemente en mamíferos.

Según se usa aquí, el término “muteínas” se refiere a análogos de una IL-18BP, o análogos de una IL-18BP vírica, en la que uno o más de los residuos de aminoácidos de una IL-18BP natural o IL-18BP vírica están sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos, o están suprimidos, o se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia natural de una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo natural o la IL-18BP vírica. Estas muteínas se preparan por síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al lugar, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Las muteínas según la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una IL-18BP o codifica una IL-18BP vírica (documento WO9909063) en condiciones rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones de hibridación y lavado subsiguiente, a las que los de experiencia ordinaria en la técnica se refieren convencionalmente como “rigurosas”. Véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio en, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5% de SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y después, un 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los de experiencia ordinaria en esta técnica entienden que las condiciones de rigor también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o sondas de oligonucleótidos mezcladas. Si se usan sondas mezcladas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, *supra*.

Identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de las dos secuencias de polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, sobre la longitud de las secuencias que se comparan.

Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, puede determinarse un “% de identidad”. En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “huecos” en una o ambas secuencias, para aumentar el grado de alineamiento. Puede determinarse un % de identidad sobre la longitud completa de cada una de las secuencias comparadas (denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de la misma o muy similar longitud, o sobre longitudes definidas, más cortas, (denominado alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para compara la identidad y homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden usarse programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J *et al.*, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. El BESTFIT usa el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también son conocidos en la técnica, por ejemplo la familia BLAST de programas (Altschul SF *et al.*, 1990, Altschul S F *et al.*, 1997, accesible a través de la página propia del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson WR, 1990).

Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos lo suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP, o lo suficientemente duplicativa de una IL-18BP vírica, para que tenga actividad sustancialmente similar a IL-18BP. Una actividad de IL-18BP es su capacidad de unirse a IL-18. Siempre que la muteína tenga actividad de unión sustancial a IL-18, puede usarse en la purificación de IL-18, tal como mediante cromatografía de afinidad, y puede considerarse así que tiene actividad sustancialmente similar a IL-18BP. Así, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que IL-18BP mediante experimentación rutinaria que comprende someter tal muteína, por ejemplo, a un ensayo de competición sandwich simple para determinar si se une o no a una IL-18 marcada apropiadamente, tal como radioinmunoensayo o ensayo ELISA.

En una realización preferida, cualquiera de tales muteínas tiene al menos un 40% de identidad u homología con la secuencia de una IL-18BP o un homólogo de IL-18BP codificado víricamente, como se define en el documento WO 99/09063. Más preferiblemente, tiene al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o, más preferiblemente, al menos el 90% de identidad u homología con él.

Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o muteínas de IL-BPs víricas, que pueden usarse según la presente invención, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución o polinucleótidos que pueden obtenerse rutinariamente por alguien de experiencia ordinaria en la técnica, sin experimentación indebida, en base a las enseñanzas y guías presentadas aquí.

Los cambios preferidos para muteínas según la presente invención son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de polipéptidos de, o proteínas IL-18BP o IL-18BPs víricas pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tengan propiedades fisicoquímicas lo suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es claro que pueden hacerse también inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias definidas antes sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones sólo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no separan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales supresiones y/o inserciones entran dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 4. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 5; y aún más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 367 T3

TABLA 4

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
10	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
15	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
20	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
25	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
	Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
30	Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
35	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
40	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
45	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
50	Trp	Trp

55

60

65

ES 2 313 367 T3

TABLA 5

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser,
10	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
15	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
20	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
25	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
30	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
35	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
40	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
45	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

50

55

60

65

TABLA 6

Grupos aún más preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser
10	Arg	Arg
	Leu	Leu, Ile, Met
15	Pro	Pro
	Thr	Thr
	Ala	Ala
20	Val	Val
	Gly	Gly
25	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe	Phe
	Tyr	Tyr
30	Cys	Cys, Ser
	His	His
35	Gln	Gln
	Asn	Asn
40	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
45	Met	Met, Ile, Leu
	Trp	Met

50 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de polipéptidos de, o proteínas IL-18BP, o muteínas de IL-18BPs víricas, para su uso en la presente invención, incluyen cualesquiera etapas del método conocidas, tal como se presentan en las Patentes de los EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark *et al.*; 5.116.943 de Kothe *et al.*, 4.965.195 de Namen *et al.*; 4.879.111 de Chong *et al.*; y 5.017.691 de Lee *et al.*; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la Patente de los EE.UU. N° 4.904.584 (Shaw *et al.*).

60 La expresión “proteína fusionada” se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, o una muteína o fragmento de ella, fusionada con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un tiempo de permanencia extendido en fluidos corporales. Una IL-18BP o una IL-18BP vírica puede fusionarse así con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de ella.

65 “Derivados funcionales” según se usa aquí cubre derivados de IL-18BPs o una IL-18BP vírica, y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que tienen lugar como cadenas secundarias en los residuos de los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención en tanto permanezcan aceptables farmacéuticamente, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-18BP, o IL-18BPs víricas, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas secundarias de polietilenglicol, que pueden ocultar lugares antígenos y extender la permanencia de una IL-18BP o una IL18-BP vírica en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanoilo o aroilo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, de residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Como “fracciones activas” de una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, mutéfnas y proteínas fusionadas, la presente invención cubre cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptido de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o residuos enlazados a ella, por ejemplo, residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga actividad sustancialmente similar a IL-18BP.

El término “sales” se refiere aquí a sales de grupos carboxilo y a sales de adición de ácido de grupos amino de molécula de inhibidor de IL-18, o análogos de ellos. Pueden formarse sales de un grupo carboxilo por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualesquiera de tales sales debe conservar la actividad biológica del inhibidor de IL-18, tal como inducción de IFN-gamma en células sanguíneas.

Las secuencias de IL18-BP y sus variantes de empalme/isoformas pueden tomarse del documento WO99/09063 o de Novick *et al.*, 1999, así como de Kim *et al.*, 2000.

Pueden conjugarse a polímeros derivados funcionales de IL-18BP con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la vida media, la biodisponibilidad, la tolerancia por el cuerpo humano o la inmunogenicidad. Para conseguir este objetivo, la IL-18BP puede enlazarse a, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede realizarse por métodos conocidos, descritos por ejemplo en el documento WO 92/13095.

Por tanto, en una realización preferida, el derivado funcional comprende al menos un resto incorporado a uno o más grupos funcionales, que tienen lugar como una o más cadenas secundarias en los residuos de aminoácidos. Es altamente preferida una realización en la que el resto es un resto de polietilenglicol (PEG).

En una realización preferida adicional de la invención, la IL18-BP comprende una fusión de inmunoglobulina, es decir, el inhibidor de IL-18 es una proteína fusionada que comprende la totalidad o parte de una proteína de unión a IL-18, que está fusionada a la totalidad o una porción de una inmunoglobulina. Los métodos para producir proteínas de fusión de inmunoglobulina son muy conocidos en la técnica, tal como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. La persona experta en la técnica entenderá que la proteína de fusión resultante de la invención conserva la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa, o mediante un péptido enlazador corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, de 13 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho enlazador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia enlazadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de IL18-BP y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, tal como un tiempo de permanencia extendido en fluidos corporales (vida media), actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado, o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En una realización preferida, la IL-18BP se fusiona a la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona a regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, por ejemplo. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina se describen en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. También son adecuadas otras isoformas de moléculas de Ig para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero u homomultímeras.

En un tercer aspecto, la invención describe una preparación de proteína resultante del procedimiento de purificación según la invención. Tal preparación de proteína contiene preferiblemente IL-18BP con una pureza que es > 50%, más preferiblemente > 60% y aún más preferiblemente > 70%. La IL-18BP presente en esta preparación de proteína tiene preferiblemente un bajo contenido de dímeros y agregados, preferiblemente sin dímeros y agregados en absoluto. Se prefiere adicionalmente que la extensión de la truncación de la IL-18BP presente en la preparación de proteína de la invención sea < 10%, puede ser < 9%, < 8%, < 7%, < 6% y preferiblemente < 5%, o incluso < 4%, < 3%, < 2% o < 1%.

La IL-18BP que se ha purificado según la presente invención tiene preferiblemente además un perfil de isoformas específico, medido, por ejemplo, por electroforesis de zona capilar. Se prefiere que la IL-18BP contenga menos del 5% de isoformas básicas, menos del 25% de isoformas menos ácidas, más del 45% de isoformas ácidas y más del 15% de isoformas altamente ácidas. La clasificación de isoformas es como se define en el Ejemplo siguiente.

Si se usan etapas de purificación adicionales, preferiblemente usando las etapas adicionales descritas antes, la preparación de IL-18BP obtenida puede contener menos del 20% de impurezas, preferiblemente menos de alrededor del 15%, o aproximadamente el 14%, o aproximadamente el 13%, o aproximadamente el 12%, o aproximadamente el 11% de impurezas. Preferiblemente, contiene menos de aproximadamente el 10%, o aproximadamente el 5%, 3%, 2% o 1% de impurezas, o puede purificarse hasta homogeneidad, es decir, estando esencialmente libre de contaminantes proteínicos.

La IL-18BP purificada puede proponerse para uso terapéutico, es decir, para administración a pacientes. Si la IL-18BP purificada se administra a pacientes, se administra preferiblemente sistémicamente, y preferiblemente subcutánea o intramuscularmente, o tópicamente, es decir, localmente. También puede ser adecuada la administración rectal o intratecal, dependiendo del uso específico de la IL-18BP purificada.

Para este fin, la IL-18BP purificada puede formularse como una composición farmacéutica, es decir, junto con un portador, excipientes o similares aceptables farmacéuticamente.

La definición de “aceptable farmacéuticamente” quiere decir abarcar cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) formularse en una forma de dosificación unitaria para inyección en portadores tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según la invención pueden administrarse a un individuo de una variedad de formas. Las vías de administración incluyen vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Puede usarse cualquier otra vía de administración eficaz terapéuticamente, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o por terapia génica, en la que se administra al paciente (por ejemplo, mediante un vector) una molécula de ADN que codifica el agente activo, lo que hace que el agente activo se exprese y segregue in vivo. Además, la(s) proteína(s) según la invención puede(n) administrarse junto con otros componentes de agentes activos biológicamente tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos aceptables farmacéuticamente.

Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral aceptable farmacéuticamente (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, agentes de conservación y tampones). La formulación se esteriliza por técnicas usadas comúnmente.

La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) según la invención puede mejorarse también usando procedimientos de conjugación que aumentan la vida media de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo enlazando la molécula a polietilenglicol (PEG), como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

Las cantidades eficaces terapéuticamente de la(s) proteína(s) activa(s) serán función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por IL-18, cualquier actividad citotóxica residual presentada por los antagonistas, la vía de administración y el estado clínico del paciente (incluyendo lo deseable de mantener un nivel no tóxico de actividad de IL-18 endógena).

Una “cantidad eficaz terapéuticamente” es tal que, cuando se administra, el inhibidor de IL-18 produce la inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosificación administrada, como dosis simples o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía de administración, los estados y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, estatura), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos in vitro e in vivo para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.

Puede usarse IL-18BP purificada en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg o aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

En realizaciones preferidas adicionales, la IL-18BP purificada se administra diariamente o cada dos días o tres veces por semana o una vez por semana.

Las dosis diarias se dan usualmente en dosis divididas o en forma de liberación sostenida eficaces para obtener los resultados deseados. La segunda o subsiguientes administraciones pueden realizarse con una dosificación que sea igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. Puede administrarse una administración segunda o subsiguiente durante o antes del ataque de la enfermedad.

Según la invención, puede administrarse IL-18BP purificada profiláctica o terapéuticamente a un individuo antes de, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de fármacos múltiples), en una cantidad eficaz terapéuticamente.

La IL-18BP purificada puede usarse para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un cierto número de enfermedades o trastornos. Tales enfermedades o trastornos son preferiblemente trastornos mediados por IL-18. En particular, puede usarse IL-18BP purificada para tratamiento y/o prevención de psoriasis, artritis psoriática, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, daño al hígado tal como cirrosis hepática
 5 alcohólica, sepsis, aterosclerosis, enfermedades cardíacas isquémicas, alergias, en particular hipersensibilidad de tipo retardado, y daño a la cabeza cerrado.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de un sistema de dos fases acuosas para la purificación de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP). Preferiblemente, el sistema de dos fases acuosas se usa para la captura de IL-
 10 18BP desde un fluido.

Con referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales, no hay en modo alguno reconocimiento de que algún aspecto, descripción o realización de la presente invención se describan, enseñen o sugieran en la técnica relevante.

Ha de entenderse que la fraseología o terminología aquí es con el fin de descripción y no de limitación, de tal modo que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva ha de interpretarse por el técnico experto a la luz de las enseñanzas y guía presentadas aquí, en combinación con el conocimiento de alguien de experiencia ordinaria en la técnica.

Ejemplo

Purificación de IL-18BP humana recombinante a partir de cosecha de células CHO exenta de suero

En el presente ejemplo, se ha desarrollado una etapa de purificación basada en un sistema de dos fases acuosas para la purificación de IL-18BP de una cosecha de células CHO. Con este fin, se realizaron las siguientes etapas:

1. Selección de los componentes formadores de fases (parejas) a examinar.
- 30 2. Primeros experimentos de diseño factorial. Para cada pareja seleccionada simple, se examinaron todos los factores principales que afectan al reparto de proteína en un espacio experimental amplio.
3. Segundos experimentos de diseño factorial. Sólo se examinaron factores importantes que afectan al reparto de la proteína objetivo en un espacio experimental reducido.
- 35 4. Se verificaron experimentalmente indicaciones predichas por el modelo.
5. Se optimizaron las indicaciones y se ajustaron con precisión.
- 40 6. Se aumentaron de escala las indicaciones hasta una escala de 1 litro.

Selección de los componentes formadores de dos fases

Se consideraron diferentes factores para la selección de los componentes formadores de fases: (i) compatibilidad del procedimiento; (ii) precio de los componentes; (iii) disponibilidad de los componentes; (iv) datos bibliográficos. En términos de compatibilidad del procedimiento, precio y disponibilidad, las parejas PEG/sal eran apropiadas. Se seleccionaron las PEG/(NH₄)₂SO₄, PEG/KH₂PO₄ y PEG/Na₂SO₄.

Por tanto, las tres parejas estudiadas fueron:

1. PEG/(NH₄)₂SO₄
2. PEG/KH₂PO₄
- 55 3. PEG/Na₂SO₄

Primer ciclo de experimentos de diseño factorial

El propósito de este ciclo de experimentos de diseño factorial era seleccionar los componentes formadores de fases apropiados que mostraban reparto de proteína extremo.

El experimento usado fue un diseño compuesto central que incluía un factorial fraccionado de 2⁵⁻¹, 10 puntos estrella y 2 puntos centrales. El diseño permitía la estimación de todos los efectos principales e interacciones de dos factores y todos los efectos cuadráticos puros de los factores experimentales. La Tabla A resume el tipo de factores experimentales y los niveles considerados. Corresponde a 28 experimentos por pareja seleccionada.

ES 2 313 367 T3

TABLA A

Factores examinados en el primer ciclo de experimentos de diseño factorial

Factor	Nivel				
Temperatura °C	4	6,5	13	19,5	30
pH ^a	5	6	7	8	9
Conc. de NaCl % (p/p)	0	2	4	6	8
P.m. de PEG	2000	6000		10000	
Longitud de línea de conexión ^a	-1	0		1	

^aLa longitud de la línea de conexión está relacionada con la concentración de componentes formadores de fase.

Las condiciones experimentales que se usaron se describen en las Tablas B, C y D.

TABLA B

Condiciones para IL-18BP en PEG/KH₂PO₄

Orden de prueba	NaCl % (p/p)	pH	P.m. PEG	Línea de conexión	KH ₂ PO ₄ % (p/p)	PEG % (p/p)	Temp. [°C]
7	0,5	6	2000	-1	10	12	19,5
16	1,5	6	2000	-1	10	12	6,5
13	0,5	8	2000	-1	10	12	6,5
12	1,5	8	2000	-1	10	12	19,5
2	0,5	6	10000	-1	10	10	6,5
10	1,5	6	10000	-1	10	10	19,5
14	0,5	8	10000	-1	10	10	19,5
15	1,5	8	10000	-1	10	10	6,5
11	0,5	6	2000	1	10	20	6,5
17	1,5	6	2000	1	10	20	19,5
26	0,5	8	2000	1	10	20	19,5
18	1,5	8	2000	1	10	20	6,5
22	0,5	6	10000	1	10	20	19,5
20	1,5	6	10000	1	10	20	6,5
21	0,5	8	10000	1	10	20	6,5
1	1,5	8	10000	1	10	20	19,5
8	1	7	6000	0	10	15	13
25	1	7	6000	0	10	15	13
24	0	7	6000	0	10	15	13
19	2	7	6000	0	10	15	13
3	1	5	6000	0	10	15	13
28	1	9	6000	0	10	15	13
9	1	7	2000	0	10	16	13
5	1	7	10000	0	10	15	13
4	1	7	6000	-1	10	12	13
23	1	7	6000	1	10	18	13
6	1	7	6000	0	10	15	4
27	1	7	6000	0	10	15	30

ES 2 313 367 T3

TABLA C

Condiciones para IL-18BP en PEG/(NH₄)₂SO₄

Orden de prueba	NaCl % (p/p)	pH	P.m. PEG	Línea de conexión	(NH ₄) ₂ SO ₄ % (p/p)	PEG % (p/p)	Temp. [°C]
7	0,5	6	2000	-1	12	12	19,5
16	1,5	6	2000	-1	12	12	6,5
13	0,5	8	2000	-1	12	12	6,5
12	1,5	8	2000	-1	12	12	19,5
2	0,5	6	10000	-1	12	12	6,5
10	1,5	6	10000	-1	12	12	19,5
14	0,5	8	10000	-1	12	12	19,5
15	1,5	8	10000	-1	12	12	6,5
11	0,5	6	2000	1	20	20	6,5
17	1,5	6	2000	1	20	20	19,5
26	0,5	8	2000	1	20	20	19,5
18	1,5	8	2000	1	20	20	6,5
22	0,5	6	10000	1	20	20	19,5
20	1,5	6	10000	1	20	20	6,5
21	0,5	8	10000	1	20	20	6,5
1	1,5	8	10000	1	20	20	19,5
8	1	7	6000	0	16	16	13
25	1	7	6000	0	16	16	13
24	0	7	6000	0	16	16	13
19	2	7	6000	0	16	16	13
3	1	5	6000	0	16	16	13
28	1	9	6000	0	16	16	13
9	1	7	2000	0	16	16	13
5	1	7	10000	0	16	16	13
4	1	7	6000	-1	12	12	13
23	1	7	6000	1	20	20	13
6	1	7	6000	0	16	16	4
27	1	7	6000	0	16	16	30

ES 2 313 367 T3

TABLA D

Condiciones para IL-18BP en PEG/Na₂SO₄

Orden de prueba	NaCl % (p/p)	pH	P.m. PEG	Línea de conexión	Na ₂ SO ₄ % (p/p)	PEG % (p/p)	Temp. [°C]
7	0,5	6	2000	-1	10	10	19,5
16	1,5	6	2000	-1	10	10	6,5
13	0,5	8	2000	-1	10	10	6,5
12	1,5	8	2000	-1	10	10	19,5
2	0,5	6	10000	-1	10	10	6,5
10	1,5	6	10000	-1	10	10	19,5
14	0,5	8	10000	-1	10	10	19,5
15	1,5	8	10000	-1	10	10	6,5
11	0,5	6	2000	1	15	15	6,5
17	1,5	6	2000	1	15	15	19,5
26	0,5	8	2000	1	15	15	19,5
18	1,5	8	2000	1	15	15	6,5
22	0,5	6	10000	1	15	15	19,5
20	1,5	6	10000	1	15	15	6,5
21	0,5	8	10000	1	15	15	6,5
1	1,5	8	10000	1	15	15	19,5
8	1	7	6000	0	12,5	12,5	13
25	1	7	6000	0	12,5	12,5	13
24	0	7	6000	0	12,5	12,5	13
19	2	7	6000	0	12,5	12,5	13
3	1	5	6000	0	12,5	12,5	13
28	1	9	6000	0	12,5	12,5	13
9	1	7	2000	0	12,5	12,5	13
5	1	7	10000	0	12,5	12,5	13
4	1	7	6000	-1	10	10	13
23	1	7	6000	1	15	15	13
6	1	7	6000	0	12,5	12,5	4
27	1	7	6000	0	12,5	12,5	30

Debido al alto número de muestras generadas durante este primer ciclo (3 parejas x 28 experimentos x 2 fases = 168), se usó IL-18BP purificada y se estimó la concentración de proteína por absorbancia UV a 280 nm. Se realizaron experimentos a escala de 2 ml. La respuesta recogida fue el coeficiente de reparto K definido como:

$$K = \frac{C_{\text{proteína fase superior}}}{C_{\text{proteína fase inferior}}}$$

Ecuación 1

ES 2 313 367 T3

Resultados

Los datos brutos se describen en la Tabla E.

TABLA E

Resultados para el primer ciclo de experimentos de diseño factorial

PEG/KH ₂ PO ₄ PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄ PEG/Na ₂ SO ₄			
Orden de prueba	K _(IL-18BP)	K _(IL-18BP)	K _(IL-18BP)
7	1,5	99,7	12,3
16	0,3	41,1	7,3
13	2,0	289,8	5,9
12	0,6	67,4	3,1
2	1,8	6,1	12,7
10	0,5	8,4	8,7
14	2,9	26,7	5,8
15	2,4	49,0	7,2
11	0,7	97,2	22,0
17	0,5	65,9	37,1
26	2,3	113,1	25,7
18	1,7	170,4	11,5
22	1,1	324,5	101,6
20	0,8	132,8	21,9
21	4,7	78,4	59,8
1	2,3	132,9	32,5
8	1,3	65,3	60,3
25	1,6	3,2	58,9
24	4,0	9,0	49,7
19	0,5	64,0	36,5
3	1,1	72,4	45,4
28	5,7	145,1	129,7
9	0,6	253,7	19,7
5	2,1	129,0	43,6
4	0,8	23,1	8,5
23	1,6	131,2	135,5
6	1,2	48,1	48,7
27	0,5	196,3	94,3

El intervalo de valores del coeficiente de reparto recogidos para los tres experimentos de diseño factorial se ilustran en la Tabla F.

TABLA F

Intervalo de valores del coeficiente de reparto obtenidos después de experimentos de diseño factorial usando parejas formadoras de fases

PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄ , PEG/KH ₂ PO ₄ y PEG/Na ₂ SO ₄			
	PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG/Na ₂ SO ₄	PEG/KH ₂ PO ₄
K _(IL18-BP)	3,2-324,5	3,1-135,5	0,3-5,7

ES 2 313 367 T3

Se realizó un análisis estadístico sobre el reparto de IL-18BP usando PEG/Na₂SO₄ o PEG/KH₂PO₄. Se eliminaron primero del análisis estadístico los factores con pequeña influencia en el reparto de proteína. Este análisis produce modelos matemáticos (Ecuación 2 y Ecuación 3), que predicen el valor de K, que tienen en cuenta los factores que se han encontrado tienen efectos significativos en la respuesta K.

Modelo que predice el reparto de IL-18BP usando PEG/Na₂SO₄

Ecuación 2

$$\text{LnK(IL-18BP)} = 4,11 + 0,26 \cdot \text{P.m.PEG} - 0,76 \cdot \text{P.m.PEG}^2 + 0,81 \cdot \text{TL} - 0,62 \cdot \text{TL}^2$$

$$R^2 = 0,81, \text{ D.T.} = 0,49$$

Modelo que predice el reparto de IL-18BP usando PEG/KH₂PO₄

Ecuación 3

$$\text{cLnK(IL-18BP)} = 0,085 - 0,42 \cdot [\text{NaCl}] + 0,31 \cdot \text{P.m.PEG} + 0,47 \cdot \text{pH} + 0,18 \cdot \text{pH}^2$$

$$R^2 = 0,80, \text{ D.T.} = 0,37$$

Los valores K máximos para el modelo predicho se ilustran en la Tabla G.

TABLA G

Coficiente de reparto K máximo predicho por el modelo

	IL18-BP usando PEG/Na ₂ SO ₄	IL-18BP usando PEG/KH ₂ PO ₄
K	81,5	3,4

Segundo ciclo de experimentos de diseño factorial

La intención de este ciclo de experimentos de diseño factorial era seleccionar las condiciones apropiadas (pH, concentraciones, etc.) que muestran reparto de proteína extremo y buenos factores de purificación. Este ciclo se realizó usando PEG/Na₂SO₄ como componentes formadores de fase.

El diseño experimental fue un diseño compuesto central. El diseño incluía un factorial de dos niveles completo, puntos estrella y un punto central, con duplicados de cada marco experimental. Resultaron hasta 52 experimentos, como se muestra en la Tabla H.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 367 T3

TABLA H

Condiciones experimentales para el segundo ciclo de experimentos de diseño factorial

Orden de prueba	P.m. PEG	pH	NaCl % [p/p]	PEG % [p/p]	Na ₂ SO ₄ % [p/p]
1	6000	9	0	11,25	11,25
2	6000	5	0	13,75	13,75
3	6000	5	0	11,25	11,25
4	6000	9	0	11,25	11,25
5	6000	9	10	13,75	13,75
6	6000	5	10	11,25	11,25
7	6000	9	0	13,75	13,75
8	6000	5	0	11,25	11,25
9	6000	9	10	11,25	11,25
10	6000	7	5	12,50	12,50
11	6000	5	10	11,25	11,25
12	6000	7	5	12,50	12,50
13	6000	9	0	13,75	13,75
14	6000	5	10	13,75	13,75
15	6000	9	10	11,25	11,25
16	6000	5	0	13,75	13,75
17	6000	9	10	13,75	13,75
18	6000	5	10	13,75	13,75
19	8000	7	5	12,50	12,50
20	8000	7	5	12,50	12,50
21	8000	7	5	12,50	12,50
22	8000	7	0	12,50	12,50

ES 2 313 367 T3

5	23	8000	9	5	12,50	12,50
	24	8000	7	5	10,00	10,00
	25	8000	7	5	15,00	15,00
	26	8000	5	5	12,50	12,50
	27	8000	7	5	15,00	15,00
	28	8000	7	10	12,50	12,50
10	29	8000	7	10	12,50	12,50
	30	8000	7	5	12,50	12,50
	31	8000	7	5	10,00	10,00
	32	8000	9	5	12,50	12,50
15	33	8000	7	0	12,50	12,50
	34	8000	5	5	12,50	12,50
	35	10000	9	0	11,25	11,25
20	36	10000	5	0	13,75	13,75
	37	10000	9	10	11,25	11,25
	38	10000	5	0	11,25	11,25
	39	10000	5	0	13,75	13,75
25	40	10000	7	5	12,50	12,50
	41	10000	7	5	12,50	12,50
	42	10000	9	0	13,75	13,75
	43	10000	9	0	11,25	11,25
30	44	10000	5	10	11,25	11,25
	45	10000	9	0	13,75	13,75
	46	10000	9	10	13,75	13,75
35	47	10000	9	10	11,25	11,25
	48	10000	5	10	11,25	11,25
	49	10000	5	10	13,75	13,75
	50	10000	5	10	13,75	13,75
40	51	10000	5	0	11,25	11,25
	52	10000	9	10	13,75	13,75

45 A diferencia del primer ciclo de experimentos de diseño factorial, la cosecha cruda clarificada se usó como material de partida. Los experimentos se realizaron a escala de 10 ml. Se recogieron dos respuestas: el coeficiente de reparto de IL-18BP $K_{(IL-18BP)}$, relacionado con la capacidad del procedimiento, y el coeficiente de reparto de proteína total $K_{(prot\ tot)}$, relacionado con la capacidad de purificación del procedimiento.

50 Resultados

Los datos brutos se presentan en la Tabla I.

TABLA I

55 *Resultados del segundo ciclo de experimentos de diseño factorial*

60	Matraz	Conc. de IL-18BP [mg/l]			Conc. de proteína total [mg/l]		
		Fase superior	Fase inferior	K _(IL-18BP)	Fase superior	Fase inferior	K _(prot tot)
	1	35,5	36,8	0,96	113	91	1,24
	2	29,4	51,7	0,57	108	109	0,99
	3	18,4	50	0,37	112	101	1,11
65	4	34,3	44	0,78	104	95	1,09
	5	65,1	51,6	1,26	165	62	2,66

ES 2 313 367 T3

	6	38,7	64,1	0,60	112	73	1,53
	7	127	5,3	23,96	184	25	7,36
5	8	18,6	58,2	0,32	129	111	1,16
	9	64,2	43,9	1,46	151	55	2,75
	10	25,5	83,5	0,31	87	115	0,76
	11	26,3	81,7	0,32	84	79	1,06
10	12	26,8	74,6	0,36	87	97	0,90
	13	74,6	12,5	5,97	147	72	2,04
	14	43,8	91,1	0,48	87	79	1,10
	15	54,1	47,2	1,15	87	52	1,67
15	16	38,2	57,3	0,67	89	90	0,99
	17	44,6	83,8	0,53	69	75	0,92
	18	43,1	83	0,52	88	71	1,24
20	19	48,1	37,2	1,29	145	64	2,27
	20	92,7	45	2,06	77	77	1,00
	21	51,5	45,5	1,13	108	66	1,64
	22	34,6	44,8	0,77	102	89	1,15
25	23	87,1	36,3	2,40	147	82	1,79
	24	26,1	64,1	0,41	95	91	1,04
	25	25,5	5,3	4,81	106	56	1,89
	26	61,4	45,2	1,36	147	77	1,91
30	27	64,1	2,65	24,19	114	53	2,15
	28	110	33	3,33	195	48	4,06
	29	49,5	45	1,10	153	64	2,39
35	30	34,8	51,7	0,67	138	99	1,39
	31	26,2	60,4	0,43	103	95	1,08
	32	37,5	39,3	0,95	106	79	1,34
	33	37,7	53,2	0,71	112	83	1,35
40	34	31,1	38,9	0,80	106	82	1,29
	35	33,6	34,6	0,97	107	87	1,23
	36	29,4	27,7	1,06	184	93	1,98
45	37	47	32,1	1,46	161	55	2,93
	38	13,3	44,5	0,30	102	94	1,09
	39	36,6	23,1	1,58	138	74	1,86
	40	27,7	47,4	0,58	125	82	1,52
50	41	29,8	46,8	0,64	108	86	1,26
	42	79,2	8,9	8,90	353	70	5,04
	43	23,8	41,7	0,57	118	117	1,01
	44	42	42,1	1,00	143	67	2,13
55	45	62,8	8,02	7,83	191	78	2,45
	46	110	11,1	9,91	354	37	9,57
	47	61,1	28,8	2,12	217	56	3,88
60	48	38,4	41,6	0,92	154	65	2,37
	49	61,1	23,3	2,62	174	51	3,41
	50	86,5	17,4	4,97	271	50	5,42
	51	14	47,1	0,30	103	130	0,79
65	52	70,8	16	4,43	212	65	3,26

ES 2 313 367 T3

Los intervalos de valores del coeficiente de reparto observados para los experimentos de diseño factorial se ilustran en la Tabla J.

TABLA J

Intervalo de valores de coeficientes de reparto para IL-18BP y proteínas totales obtenidos por experimentos de diseño factorial usando PEG/Na₂SO₄

$K_{(IL-18BP)}$	$K_{(prot. total)}$
0,3-24,2	0,8-9,6

Se realizó un análisis estadístico sobre el reparto de IL-18BP y de proteínas totales. En contraste con el primer ciclo de experimentos, los resultados de este análisis señalados en la Tabla K y la Tabla L indican que se encontraron significativos los cuatro factores principales ensayados, como lo fueron muchas interacciones de segundo grado.

TABLA K

Producción del modelo de regresión cuadrática para $\ln K_{(IL-18BP)}$

Factor	Valor	Error típico
Ordenada en el origen	-0,0552	0,1652
[NaCl]	0,0854	0,0886
pH	0,5462	0,0886
P.m. PEG	0,3254	0,0886
Línea de conexión	0,6627	0,0767
[NaCl] ²	0,3325	0,2254
pH ²	0,3861	0,2254
(P.m. PEG) ²	-0,6413	0,2254
(Línea de conexión) ²	0,2092	0,074
[NaCl]•pH	-0,2428	0,0939
[NaCl]•P.m. PEG	0,3163	0,0939
[NaCl]•Línea de conexión	-0,2988	0,0939
pH•P.m. PEG	-0,0921	0,0939
pH•Línea de conexión	0,1501	0,0939
P.m. PEG•Línea de conexión	0,2287	0,0939

Error típico residual: 0,5314 en 37 grados de libertad; R-cuadrado múltiple: 0,8312; F-estadístico: 13,01 en 14 y 37 grados de libertad, el valor p es 2,76e-010

ES 2 313 367 T3

TABLA L

Producción del modelo de regresión cuadrática para $\ln K_{(\text{prot. total})}$

Factor	Valor	Error típico
Ordenada en el origen	0,2798	0,115
[NaCl]	0,2314	0,0586
pH	0,2023	0,0586
P.m. PEG	0,246	0,0586
Línea de conexión	0,2072	0,0508
[NaCl] ²	0,3959	0,1496
pH ²	0,1639	0,1496
(P.m. PEG) ²	-0,216	0,1496
(Línea de conexión) ²	0,0254	0,0496
[NaCl]•pH	-0,044	0,0622
[NaCl]•P.m. PEG	0,2048	0,0622
[NaCl]•Línea de conexión	-0,1369	0,0622
pH•P.m. PEG	-0,0468	0,0622
pH•Línea de conexión	0,097	0,0622
P.m. PEG•Línea de conexión	0,1482	0,0622

Error típico residual: 0,3517 en 36 grados de libertad; R-cuadrado múltiple: 0,7351; F-estadístico: 7,138 en 14 y 36 grados de libertad, el valor p es 9,826e-007

Los modelos que predicen el segundo ciclo de experimentos de diseño factorial permitieron la selección de 28 condiciones candidatas, que mostraban un rendimiento predicho > 75% y una pureza en la fracción post-A2PS mayor del 50%. Las condiciones candidatas se listan en la Tabla M.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 367 T3

TABLA M

Condiciones candidatas seleccionadas de un análisis estadístico del segundo ciclo de experimentos de diseño factorial

Condiciones	NaCl % [p/p]	pH	P.m. PEG	PEG % [p/p]	Na ₂ SO ₄ % [p/p]
val2-1	0	5	10000	10	10
val2-2	0	7	10000	10	10
val2-3	10	5	6000	10	10
val2-4	10	7	10000	10	10
val2-5	0	5	10000	11,25	11,25
val2-6	0	7	10000	11,25	11,25
val2-7	10	9	6000	12,5	12,5
val2-8	0	5	6000	10	10
val2-9	0	9	8000	13,75	13,75
val2-10	0	7	6000	15	15
val2-11	0	9	6000	15	15
val2-12	5	9	6000	15	15
val2-13	0	5	8000	15	15
val2-14	5	5	8000	15	15
val2-15	0	7	8000	15	15
val2-16	5	7	8000	15	15
val2-17	0	9	8000	15	15
val2-18	5	9	8000	15	15
val2-19	10	9	8000	15	15
val2-20	0	5	10000	15	15
val2-21	0	7	10000	15	15
val2-22	5	7	10000	15	15
val2-23	0	9	10000	15	15
val2-24	5	9	10000	15	15
val2-25	10	9	10000	15	15
val2-26	10	7	8000	10	10
val2-27	10	5	6000	12,5	12,5
val2-28	10	7	6000	12,5	12,5

Verificación experimental de las indicaciones predichas por el modelo de predicción

El propósito de estos experimentos era verificar experimentalmente el funcionamiento de las indicaciones predichas por el análisis estadístico. Se usó la cosecha cruda clarificada como material de partida. Los experimentos se realizaron a escala de 10 ml. Se recogieron dos respuestas: el coeficiente de reparto de IL-18BP $K_{(IL-18BP)}$, y el coeficiente de reparto de proteína total $K_{(prot\ tot)}$. Las condiciones experimentales se describen en la anterior Tabla M.

Resultados

Los resultados se indican en la Tabla N. La concentración de IL-18BP se midió por BIAcore con un anticuerpo monoclonal inmovilizado que detecta IL-18BP, denominado Mab 582.1. La concentración de IL-18BP se midió por el método BIAcore® según las instrucciones del fabricante, usando los siguientes parámetros:

ES 2 313 367 T3

Caracterización del volumen	Unidades	Especificación	VOLUMEN 1 7075-035-01 UF2	VOLUMEN 2 7075-41-05 UF2
Cuantificación				
Contenido de proteína	mg/m; $\alpha=1,26$ a 280 nm		0,584	0,171
RP-HPLC	mg/ml		0,586	0,141
Conformidad del producto				
Perfil de isoformas por IEF/WB		aglomeración de bandas cae por debajo de pI 4,6 como en referencia	atípico (aglomeración por debajo de pI 3,5)	atípico (aglomeración por debajo de pI 4,2)
Perfil de isoformas por CZE	%	M0+M1<30%	M0=0%	M0=0,6%
			M1=13,7%	M1=10,3%
	%	M2	M2=68,6%	M2=71,6%
	%	M3	M3=17,7%	M3=17,5%
Impurezas basadas en producto				
Dímeros y peso molecular superior (SE-HPLC)	%		92,6	93,3
Dímeros y peso molecular superior (SDS/WB)	%		Dímeros:8% (28%) Agregados: 0%(15%)	Dímeros:0% (33%) Agregados: 0%(n/a)
Formas truncadas (SDS/WB)	%		21% (22%)	4% (7%)
Impurezas basadas en el procedimiento				
Contaminaciones de proteínas derivadas del cultivo de células	ng/mg		51	69
ADN residual			no realizado	no realizado

TABLA N

Resultados experimentales de las condiciones candidatas

Condiciones	IL-18BP de equilibrio	Rendimiento %	Pureza % (Biacore/Bradford)
<i>Cosecha</i>	<i>B76.B1377.237</i>		40
val2-1	1,07	107	69

ES 2 313 367 T3

5	val2-2	1,12	112	56
	val2-3	1,18	65	93
	val2-4	1,08	86	59
	val2-5	0,99	98	92
	val2-6	0,91	89	59
	val2-7	1,16	64	66
10	val2-8	0,89	54	32
	val2-9	0,62	54	55
	val2-10	0,18	11	19
	val2-11	0,13	11	31
15	val2-12	0,35	30	43
	val2-13	0,10	6	20
	val2-14	0,21	19	32
20	val2-15	0,59	54	42
	val2-16	0,91	67	65
	val2-17	0,11	8	29
	val2-18	1,01	74	74
25	val2-19	1,01	60	63
	val2-20	0,10	7	36
	val2-21	0,06	4	18
	val2-22	0,34	20	56
30	val2-23	0,10	4	11
	val2-24	0,72	52	36
	val2-25	1,00	54	0
35	val2-26	1,13	75	77
	val2-27	1,00	64	97
	val2-28	1,04	56	89

40 Se han identificado tres indicaciones a partir del modelo estadístico. Los parámetros relativos a estas indicaciones se ilustran en la siguiente Tabla O. La Electroforesis de Zona Capilar (CZE) se realizó según el siguiente método:

Materiales y equipo para electroforesis de zona capilar

45	<i>Materiales</i>	
	Agua purificada MilliQ	Millipore o equivalente
50	Ácido trifluoroacético (TFA) cod. 9470	Baker o equivalente
	Acetonitrilo (CH ₃ CN) (nº de Cat. 30)	Merck o equivalente
	NaOH 50% "Baker analyzed" nº de Cat. 7067	Baker
55	Tampón fosfato eCAP® 50 mM, pH 7,0 (nº de Cat. 477423)	Beckman Coulter
	Material de referencia Interim ST1P01/r-hIL-18BP	Serono
60	Marcador neutro (nº de Cat. 477434)	Beckman Coulter
	<i>Equipos</i>	
65	Sistema P/ACE MDQ	Beckman Coulter
	Software 32 Karat® versión 4.0	Beckman Coulter

ES 2 313 367 T3

	Tubo capilar de 75 μm de D.I. eCAP® (n° de Cat. 338454)	Beckman Coulter
	Viales de PCR (n° de Cat. 144709)	Beckman Coulter
5	Resortes de Viales Micro (n° de Cat. 358821)	Beckman Coulter
	Tapones de Viales de PCR (n° de Cat. 144656)	Beckman Coulter
	Soportes de Viales (n° de Cat. 144657)	Beckman Coulter
10	Cartucho P/ACE System MDQ (n° de Cat. 144738)	Beckman Coulter
	Cartucho Sep-Pak Plus tC2 (n° de Cat. WAT052720)	Waters
15	Centricon YM-10 (n° de Cat. 4206)	Millipore
	Jeringas de 1 y 5 ml de Millipore o equivalentes	

20 *Soluciones para Sep-Pak*

- Acondicionamiento de Sep-Pak: 100% de CH_3CN
- Solución de equilibrado/lavado de Sep-Pak: 25% de CH_3CN en TFA acuoso al 0,1%
- 25 Solución de elución de Sep-Pak: 36% de CH_3CN en TFA acuoso al 0,1% (terminación: dos semanas a 4°C)

30 *Soluciones para CZE*

- Tampón de lavado/prueba de CZE fosfato 5 mM
- Se prepara por dilución 1:10 de solución madre de fosfato 50 mM pH 7,0. Se filtra a través de filtro de 0,22 μm . Se prepara reciente.
- 35 NaOH 0,5 M (solución de lavado de CZE)
- Se añaden 26,2 μl de NaOH del 50% a agua, volumen total 1 ml. Se prepara reciente.
- 40 NaOH 1 M (solución de regeneración de CZE)
- Se añaden 52,4 μl de NaOH del 50% a agua, volumen total 1 ml. Se prepara reciente.
- Marcador neutro (dilución 1:10000)
- 45 Se añaden 10 μl de solución madre de marcador neutro a agua, volumen total 1 ml.
- Se añaden 10 μl de este marcador neutro dilución 1:100 a agua, volumen total 1 ml.
- 50 Se guarda durante tres meses a 4°C.

Método

- 55 La CZE es una forma de electroforesis capilar de alta eficacia. Se llena el tubo capilar con tampón de electrolito y tiene lugar la separación de la muestra aplicando un campo eléctrico a través del tubo capilar. El mecanismo de separación se basa en diferencias de movilidad electroforética entre analitos. La movilidad electroforética es función de la carga neta de cada analito y el tamaño hidrodinámico en una condición dada.
- 60 El análisis CZE de muestras que contienen IL-18BP se realiza usando un sistema de CE con un tubo capilar de sílice de pirólisis (D.I. 75 μm y longitud efectiva de 50 cm) lleno con un tampón que contiene fosfato 5 mM.
- Para aumentar la resolución de CZE, se desalan la Referencia patrón y cada volumen mediante Centricon 10 antes de análisis CZE. Se cargan las muestras con una concentración de IL-18BP de aproximadamente 2,5 mg/ml. La inyección en el tubo capilar se realiza usando una inyección a baja presión ($\approx 35,2 \text{ g/cm}^2$) durante 5 segundos. La separación se realiza con un voltaje constante de 25 kv durante 30 min a 25°C. La prueba se vigila usando absorbancia UV a 214 nm.

ES 2 313 367 T3

Para el Patrón de Referencia y las muestras en volumen el procedimiento consiste en dos etapas: desalación de muestra y análisis CZE.

Para cosecha cruda y muestras post-captura se separa la alta interferencia de matriz para permitir observar el perfil de glicoproteína IL-18BP. En este caso, el procedimiento consiste en tres etapas: Una etapa de captura Sep-Pak para separar la alta interferencia de matriz, desalación de muestra y análisis CZE de la fracción de IL-18BP capturada.

Captura de IL-18BP por procedimiento Sep-Pak para análisis CZE de cosecha cruda y muestras post-captura

Se monta el cartucho Sep-Pak con una jeringa de 5 ml, y se sigue después el siguiente procedimiento:

TABLA (ii)

Etapas	Solución	Volumen	Eluato
Acondicionamiento (1)	100% de CH ₃ CN	5 ml	desechado
Equilibración (2)	25% de CH ₃ CN en TFA acuoso al 0,1%	5 ml	desechado
Carga de muestra (3)*		0,5 ml	desechado
Lavado (4)	25% de CH ₃ CN en TFA acuoso al 0,1%	5 ml	desechado
Elución (5)	36% de CH ₃ CN en TFA acuoso al 0,1%	0,6 ml	desechado
Elución (6)	36% de CH ₃ CN en TFA acuoso al 0,1%	2,0 ml	Recogido**

*Se cargan hasta 500 µl de muestra que tiene una concentración de IL-18BP ≥ 250 µg/ml. Si la concentración de la muestra de IL-18BP es 70÷250 µg/ml, se necesita un volumen mayor, se carga en este caso cualquier adicional hasta una muestra de 500 µl después de 2 ml de tampón de equilibración. Para muestras diluidas, se concentra hasta 500 µl por ultrafiltración Centricon/Centriplus 10 a una temperatura de 10°C.

**Se recoge el eluato en un vial que contiene 1 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,0

La solución recogida de la etapa 6 (volumen total 3 ml) se concentra en una centrífuga Speed-Vac para eliminar CH₃CN y reducir el volumen total a $\leq 2,0$ ml.

Desalación de muestra por ultrafiltración con Centricon 10

El Patrón de Referencia, o el volumen de la solución de Speed-Vac resultante de la etapa previa, se transfieren en Centricon 10 y se concentran hasta aproximadamente 100 µl por ultrafiltración a 5.000 x g y 10°C.

Se realiza después la desalación con cuatro lavados con 1 ml de H₂O a 5.000 x g y temperatura de 10°C, durante 40 minutos cada uno.

Excepto la cosecha cruda, los retenidos se diluyen y dividen en partes alícuotas (partes alícuotas de 30 µl) con una concentración de IL-18BP de 2,5 mg/ml.

Las muestras de cosecha cruda se recuperan en un volumen final de 40-50 µl. Esta cantidad es suficiente para preparar dos muestras de CZE independientes. Las muestras están ahora listas para análisis CZE.

Se guardan todas las muestras a -20°C hasta análisis CZE.

Análisis CZE

Se transfieren ≥ 20 µl de muestra/referencia en viales de PCR que contienen 1/10 de volumen de marcador neutro (3.3.4), se mezcla por pipeteado inverso y se evita que se generen burbujas.

Parámetros electroforéticos recomendados

Se añaden los siguientes reactivos en soportes de viales separados y se evita que se generen burbujas.

ES 2 313 367 T3

TABLA (iii)

Reactivos de entrada	Volumen de reactivos	Reactivos de salida	Volumen de reactivos
Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml		
Tampón de prueba (3.3.1)	1,2 ml	Tampón de prueba (3.3.1)	1,2 ml
Agua purificada	1,2 ml	Agua purificada	1,2 ml
Solución de lavado de CZE (3.3.2)	1,0 ml		
Solución de regeneración de CZE (3.3.3)*	1,0 ml		
Muestra	> 22 µl/vial de PCR		
		Residuo (agua purificada) 1	0,2 ml
		Residuo (agua purificada) 2	0,2 ml
Aire*	Vial vacío		

*se usa sólo si se requiere

Tabla de tiempos de análisis CZE

TABLA (iii)

Caso	Valor	Duración	Vial de entrada	Volumen de reactivo	Vial de salida
Presión de enjuague	1406,1 g/cm ²	2,00 min	Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de inyección	35,2 g/cm ²	5,0 s	Muestra	≥ 22 µl	Tampón de prueba (3.3.1)
Voltaje de separación	25 kv	30,00 min	Tampón de prueba (3.3.1)	1,2 ml	Tampón de prueba (3.3.1)
Presión de enjuague	1406,1 g/cm ²	1,00 min	Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de enjuague	1406,1 g/cm ²	1,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de enjuague	1406,1 g/cm ²	1,00 min	Solución de lavado de CZE (3.3.2)	1,0 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	2,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	2,00 min	Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Espera			Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Tampón de prueba (3.3.1)

Tabla de tiempos de regeneración capilar de CZE

ES 2 313 367 T3

TABLA (iv)

Caso	Valor	Duración	Vial de entrada	Volumen de reactivo	Vial de salida
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	1,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	10,00 min	Solución de regeneración de CZE (3.3.3)	1,0 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	4,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	2812,3 g/cm ²	1,00 min	Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuague	35,2 g/cm ²	30,00 min	Tampón de lavado (3.3.1)	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Espera			Tampón de prueba (3.3.1)	1,2 ml	Tampón de prueba (3.3.1)

Longitud capilar a longitud de detector/total

50/60 cm

Polaridad

positivo a negativo (adelante)

Temperatura

capilar = 25 ± 2°C

Bandeja de muestra

= 10 ± 2°C

Detección

214 nm

Métodos de inyección recomendados

Al menos tres inyecciones del material de Referencia Patrón con el propósito de acondicionamiento capilar.

Referencia Patrón 1 (inicio)

Inyección simple de muestra 1

Inyección simple de muestra 2

Inyección simple de muestra 3

Inyección simple de muestra 4

Referencia Patrón 2 (final)

Nota: Para aumentar la reproductibilidad, puede analizarse un máximo de 4 muestras en una secuencia entre la referencia 1 y la referencia 2 usando el mismo tampón de prueba de CZE. Alternativamente, pueden usarse para cada muestra dos referencias de enlace como se describe después.

Se hacen al menos tres inyecciones del material de Referencia Patrón con el fin de acondicionamiento capilar.

Referencia Patrón (inicio 1)

Inyección simple de muestra 1

Referencia Patrón (final 1/inicio 2)

ES 2 313 367 T3

Inyección simple de muestra 2

Replicado de Referencia Patrón (final 2/inicio 3)

5

Inyección simple de muestra 3

Replicado de Referencia Patrón (final 3)

10

Análisis de datos

Se usa el material de Referencia Patrón para comparación de datos de muestras.

15

Se imprimen los electroferogramas cubiertos y apilados de muestra/s y ambos patrones de referencia de enlace (inicio/final) y se los archiva en los resultados de archivo.

Determinación de tiempos de migración MT2 y MT3

20

Se determinan los tiempos de migración MT2 y MT3 en los valles a izquierda y derecha de los picos -3 y +3 del Patrón de Referencia (inicio). El pico 0 es el pico principal de la referencia.

25

Clasificación de isoformas

Debido a la alta acidez del perfil de glicoproteína IL-18BP, las isoformas entre MT2 y MT3 se denominan “*isoformas ácidas*”. Las isoformas con tiempos de migración mayores que MT3 se denominan “*isoformas altamente ácidas*”. Las isoformas con tiempos de migración más bajos que MT2 se denominan “*isoformas menos ácidas*”.

30

En algunas circunstancias, podría ser necesario añadir la clase de “*isoformas básicas*” definidas como isoformas con tiempos de migración más bajos que MT1.

35

Estimación de la abundancia de isoformas

Se analizan la referencia y cada muestra usando las funciones: *pico manual* entre MT1-MT2, MT2-MT3 y MT3-MT4; la *línea de base manual* entre 5 y 28 minutos y la *integración OFF* entre 0 y MT1 y entre MT4 y 30 minutos. Se modifican manualmente las funciones *Widthand Treshold* para obtener una integración de tres grupos de picos entre MT1-MT2 (isoformas menos ácidas), MT2-MT3 (isoformas ácidas) y MT3-MT4 (isoformas altamente ácidas) similar a la mostrada antes para el Patrón de Referencia.

40

$$\% \text{ de abundancia de isoforma} = \frac{\text{área (MT1 - MT2 o MT2 - MT3 o MT3 - MT4)}}{\text{Área total (MT1 - MT4)}}$$

45

Cuando sea necesario, se añade el grupo de picos correspondiente a “*isoformas básicas*” definidas como isoformas con tiempos de migración más bajos que MT1, y se corrige en conformidad la fórmula anterior.

50

Resultados del análisis CZE

Los perfiles de CZE mostraban que las isoformas ácidas parecían ser seleccionadas por A2PS. Los resultados de los perfiles de isoformas se representan en la Fig. 1.

55

Cálculo del rendimiento y la pureza

El rendimiento y la pureza de la IL-18BP purificada se calcularon como sigue:

60

Rendimiento

65

$$Y = \frac{V_{\text{fase}} \cdot C_{\text{fase IL18BP}}}{V_0 - V_{0\text{IL18BP}}} \cdot 100$$

Pureza

$$Y = \frac{V_{\text{fase}} \cdot C_{\text{fase}}^{\text{IL18BP}}}{V_0 - V_0^{\text{prot. total}}} \cdot 100$$

V_{fase} : volumen de la fase de interés

$C_{\text{fase}}^{\text{IL18BP}}$: Concentración de IL18BP en la fase de interés

$C_{\text{fase}}^{\text{prot. total}}$: Concentración de proteína total en la fase de interés

V_0 : volumen del material de partida a purificar

C_0^{IL18BP} : Concentración de IL18BP en el material de partida a purificar.

Resultados

Los parámetros medidos para las tres indicaciones se resumen en la Tabla O. El reparto de proteína era reproducible (véanse valores de desviación típica). No se formaron agregados durante el procedimiento.

TABLA O

Funcionamiento experimental de las indicaciones seleccionadas del modelo estadístico para captura directa de IL-18BP usando sistema de dos fases acuosas

Marca	Balance de masas IL-18BP	Rendimiento [%]	Pureza* [%] (IL-18BP/proteínas totales)	Agregados [%] (SDS-PAGE/WB)
Material de partida: B76.B1377.237			40	23
Val2-1 (n=3)	1,1 ± 0,07	107 ± 5	69 ± 5	22
Val2-2 (n=4)	1,1 ± 0,10	112 ± 7	56 ± 6	22
Val2-5 (n=4)	1,1 ± 0,05	98 ± 3	92 ± 4	21

*Ensayo de IL-18BP con Biacore, ensayo de proteína total con el método Bradford

Procedimiento de A2PS usando cosecha no clarificada

En esta sección, se valoró la purificación directa de IL-18BP a partir de cosecha no clarificada cruda. Con el fin de comparar si las células afectan al funcionamiento del procedimiento, se han comparado dos condiciones de procedimiento con y sin células (para condiciones de procedimiento, véase Tabla N).

Como se muestra en la Tabla P, los funcionamientos del procedimiento eran afectados relativamente poco por la presencia de células o residuos de células. Después de la separación de fases, muchas de las células y residuos de células estaban localizados en una interfase espesa.

ES 2 313 367 T3

TABLA P

Comparación del funcionamiento del procedimiento usando cosecha cruda clarificada y cosecha cruda no clarificada

Condiciones	K _(IL-18BP)	K _(prot. total)
val2-17 clarificada	8,4	2,7
val2-17 no clarificada	13,1	2,6
val2-21 clarificada	4,6	1,7
val2-21 no clarificada	5,1	2,2
val2-23 clarificada	2,5	0,9
val2-23 no clarificada	1,8	1,2
val2-25 clarificada	1,3	2,9
val2-25 no clarificada	1,0	3,3

Optimización de las indicaciones

El propósito de estos experimentos era optimizar el funcionamiento de las indicaciones seleccionadas previamente (Tabla O). Es posible optimizar el rendimiento, la pureza o el factor de concentración de la etapa de extracción basada en las líneas de conexión.

Concentración de Na₂SO₄

Se usa comúnmente conductimetría para determinar la concentración de sal en A2PS. Sin embargo, los medios de cultivo ya contienen alguna sal que puede afectar al análisis. Por tanto, se usó un ensayo colorimétrico (*Juego: Aquanal-plus Sulfate (SO₄)50-330 mg/l (Fluka N° 37429-1EA)* y muestra mejores resultados en ese caso.

Concentración de PEG

Puede usarse refractometría para análisis de concentración de PEG. Sin embargo, muchos componentes de medios de cultivo interfieren con el análisis. Por tanto, se usó cromatografía de exclusión por tamaño para análisis de concentración de PEG en las condiciones indicadas en la Tabla Q.

TABLA Q

Condiciones para cromatografía de exclusión por tamaño

Detección	RI
Temperatura	40°C
Columna	Shodex SB-804
Presión	30 bares
Flujo	0,8 ml/min
Eluyente	H ₂ O
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de retención	26 min

Pueden determinarse líneas de conexión midiendo los PEG y Na₂SO₄ en las fases superior e inferior (véanse Figs. 4, 5 y 6). $K_{(IL-18BP)}$ y $K_{(prot. total)}$ son constantes en la misma línea de conexión. Por tanto, una relación de fases óptima escogida para el procedimiento de purificación proporcionaría un equilibrio entre rendimiento y factor de purificación.

Se usó como material de partida cosecha cruda clarificada y los experimentos se realizaron a escala de 10 ml. Se recogieron dos respuestas: el coeficiente de reparto de IL-18BP $K_{(IL-18BP)}$, y el coeficiente de reparto de proteína total $K_{(prot. total)}$.

Resultados

Se han ensayado cuatro condiciones experimentales optimizadas. La Tabla R resume el funcionamiento del procedimiento experimental obtenido después de repartir.

TABLA R

Condiciones de procedimiento optimizadas basadas en cálculo de líneas de conexión

Condiciones	NaCl % [p/p]	pH	P.m. PEG	PEG % [p/p]	Na ₂ SO ₄ % [p/p]
val2-1 opt. 1	0	5	10000	28,6	1,9
val2-2 opt. 1	0	7	10000	28,75	2,25
val2-2 opt. 2	0	7	10000	21	5,5
val2-5 opt. 1	0	5	10000	27,9	2,8

Dependiendo del procedimiento aguas abajo y de la calidad del volumen final, pueden seleccionarse muchas más condiciones optimizadas basadas en las líneas de conexión que se muestran en las Figs. 2, 3 y 4. La flexibilidad considerando el rendimiento, la pureza o el factor de concentración basada en las líneas de conexión es una de las principales ventajas de la tecnología de A2PS.

ES 2 313 367 T3

TABLA S

Funcionamiento del procedimiento después de optimizar las condiciones val2-1, val2-2, val2-5

Marca	Balance de masas IL-18BP	Rendimiento [%]	Factor de concentración	Pureza* [%] (IL-18BP/Proteínas totales)
Material de partida:		Exp	Exp	Exp
B76 0007-E				47
val2-1 opt. 1				
val2-2 opt. 1	0,96	93	14,7	65
val2-2 opt. 2	1,04	99	13,3	62
val2-5 opt. 1	0,98	98	2,3	81
	0,88	88	6,6	88

*Ensayo de IL-18BP con Biacore, ensayo de proteína total con el método Bradford

Captura directa de IL-18BP a escala de 1 litro

El propósito de estos experimentos era evaluar los resultados principales de aumento de escala relacionados con la tecnología de A2PS. Se han seleccionado dos condiciones de la Tabla R y la Tabla S para un aumento de escala de 100 veces (val2-5; val2-2 opt 2). Los resultados se ilustran en la Tabla T. No pueden observarse grandes diferencias en el funcionamiento del procedimiento después de un aumento de escala de 100 veces.

TABLA T

Comparación de funcionamientos del procedimiento a escala de 10 ml y a escala de 1000 ml para las condiciones val2-5 y val2-2 opt 2

Marca	Balance de masas IL-18BP	Rend.	Pureza Biscore/ Bradford	Factor de purificación	Factor de con- centración	Agre- gados	CZE Básico	Menos ácido	Ácido	Altamente ácido
<i>Cosecha</i>			40%			21%	5,3	24,3	53,8	16,1
<i>B760007-E</i>										
val2-5 10 ml	0,99	98	92%	2,32	1,4	21%	2%	23,9%	56,4%	17,8%
val2-5 1000 ml	1,12	110	86%	2,15	1,5	21%	2,5%	24,1%	49,1%	24,3%
val2-2 opt 2 10 ml	0,96	93	65%	1,27	14,7	23%	2,8%	21,3%	55,1%	20,8%
val2-2 opt 2 1000 ml	1,06	101	62%	1,27	11,6	27%	3,9%	19,0%	57,7%	19,5%

Efecto del procedimiento de A2PS en la integridad de proteína y la calidad del volumen

Con el fin de estimar si la captura directa de IL-18BP usando tecnología de A2PS afecta a la calidad en volumen final, se ha purificado material post-captura de A2PS del experimento de aumento de escala val-2.5 usando etapas de purificación cromatográfica adicionales. Los resultados se ilustran en la Tabla U. En comparación con un lote de sustancia fármaco obtenido con una captura cromatográfica en Fractogel® TMAE (cromatografía de intercambio iónico de trimetilaminoetilo, comprado a Merck), el lote (7075-41-05 UF2) derivado de la captura de A2PS muestra resultados de calidad comparables.

ES 2 313 367 T3

TABLA U

Caracterización de volumen después de captura directa usando procedimiento de A2PS

	Unidades	Especificación	VOLUMEN 1 7075-035-01 UF2	Volumen 2 7075-41-05 UF2
Cuantificación				
Contenido de proteína	mg/ml; <i>alfa</i> =1,26 a 280 nm		0,584	0,171
RP-HPLC	mg/ml		0,586	0,141
Conformidad del producto				
Perfil de isoformas por IEF/WB		<i>el agrupamiento de bandas cae por debajo de pI 4,6, como en la referencia</i>	atípico (agrupamiento por debajo de pI 3,5)*	atípico (agrupamiento por debajo de pI 4,2)*
Perfil de isoformas por CZE	%	<i>M0+M1 < 30%</i>	M0=0%	M0=0,6%
			M1=13,7%	M1=10,3%
	%	<i>M2</i>	M2=68,6%	M2=71,6%
	%	<i>M3</i>	M3=17,7%	M3=17,5%
Impurezas basadas en producto				
Dímeros y peso molecular superior (SE-HPLC)	%		92,6	93,3

ES 2 313 367 T3

Dímeros y peso molecular superior (SDS/WB)	%		Dímeros:8%(18%)** Agregados:0%(15%)**	Dímeros:0%(33%)** Agregados:0%(n/a)**
Formas truncadas (SDS/WB)	%		21% (22%)	4%(7%)
Impurezas basadas en procedimiento				
Cultivo de células derivado de contaminaciones de proteínas (inmunoensayo)	ng/mg		51	69
ADN residual			no realizado	no realizado

perfil IEF/WB atípico debido a etapa CM demasiado selectiva. Valor para el material de partida

Conclusiones

La Tabla V resume los resultados obtenidos con las etapas de captura cromatográfica tradicional y muestra que el procedimiento de A2PS es más simple; puede proporcionar mejor pureza y rendimiento, y puede ser más rápido.

TABLA V

Comparación de funcionamientos de procedimientos entre diferentes etapas de captura aplicadas en IL-18BP

	Q SFF	Fractogel TMAE HiCap	A2PS
Condición de carga	UF/DF necesarias	UF/DF necesarias	Captura directa
Rendimiento	89%	91%	98%
Pureza (ELISA/Bradford)	46%	42%	72%
Tiempos de prueba	720 min	360 min	240 min

Referencias

1. Ageland, H., Nystrom, L., Persson, J., Y Tjerneld, F. **Process** for purifying a protein. (US 6559284). 2003. *Esperion Therapeutics, Inc. (Ann Arbor, MI)*.

2. Altschul S F *et al*, *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990

3. Altschul S F *et al*, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402, 1997

4. **Ananthapadmanabhan, K. P. y Goddard, E. D.** (US 4743550). 1988. (a *Union Carbide Corporation*).
5. **Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., van Cott, K., & Zhang, C.** (2003) *Journal of Chromatography A* 989, 119.
6. **Bamberger, S., Brooks, D.E., Sharp, K.A., van Alstine, J.M., & Webber, T.J.** (1985) in *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology* (Walter, H., Brooks, D.E., & Fisher, D., Eds.) pp 85 *Academic Press*, Orlando, Fla.
7. **Baskir, J.N., Hatton, T.A., & Sutter, V.W.** (1987) *Macromolecules* 20, 1300.
8. **Baskir, J.N., Hatton, T.A., & Sutter, V.W.** (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 34, 541.
9. **Bierau, H., Hinton, R.J., & Lyddiatt, A.** (2001) *Bioseparation*.
10. **Bleier, J.E., Kim, E.H., & Chen, X.D.** (2001) *Biotechnol. Prog.* 17, 697.
11. **Bompensieri, S., Malher, G.F., Castaneda, N., Miranda, M.V., Cascone, O., & Nudel, B.C.** (1998) *Biotechnology Techniques* 12, 611.
12. **Boschetti, E., Jungbauer, Sep. Sci. & Tech.** 2 No. 15, *Acad. Press* (2000) 53
13. **Boschetti et al., Genetic Engineering** Vol. 20, No. 13, July, 2000
14. **Braunstein, E. L., Becker, N. T., anshaw, G., y raycar, T. P.** (WO 96/23061). 1995. (a *Genencor International, Inc.*).
15. **Brewer, J. W., Brothers, C. E., Farver, T. F., im, C. Y., y ee, E.** (US 4728613). 1988. (a *Miles Laboratories, Inc.*).
16. **Builder, S. E., Hart, R. A., Lester, P. M., Ogez, J. R., y Reifsnnyder, D. H.** (US 5407819). 1995. (a *Genentech, Inc.*).
17. **Cordes, A. & Kula, M.R.** (1994) *Methods Enzymol* 228, 600.
18. **Costa, M.J., Cunha, M.T., Cabral, J.M., & Aires-Barros, M.R.** (2000) *Bioseparation* 9, 231.
19. **Devereux J et al, Nucleic Acids Res**, 12, 387-395, 1984.
20. **Diamond, A.D., Yu, K., & Hsu, J.T.** (1990) *ACS Symposium Series* 427, 52.
21. **Dos Reis Coimbra, J., Thömmes, J., & Kula, M.R.** (1994) *Journal of Chromatography A* 668, 85.
22. **Dove, G. B y Mitra, G.** (US 4684723). 1988. (a *Miles Laboratories, Inc.*).
23. **Duarte, M., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A., Tagliari, C.V., & Franco, T.T.** (2003) *Biorescience Progress* 68, 49.
24. **Eitman, M.A. & Gainer, J.L.** (1990) *Biotechnol. Prog.* 6, 479.
25. **Eitman, M.A. & Gainer, J.L.** (1991) *Bioseparation* 2, 31.
26. **Enfors, S. O., Külher, K., Ljungquist, Ch., Nilsson, B., y Veide, A.** (WO 92/07868). 1992. (*Pharmacia AB, Sweden*).
27. **Fernandes, S., Kim, H.S., & Hatti-Kaul, R.** (2002) *Protein Expr. Purif.* 24, 460.
28. **Grantham et al., Science**, Vol. 185, pp. 862-864 (1974)
29. **Guan, Y., Wu, S.Y., Treffy, E., & Iley, T.H.** (1992) *Biotechnol. Bioeng.* 40, 517.
30. **Guiliano, K. A. y Szlag, D. C.** (US 5093254). 1992. (a the United States).
31. **Guinn, M. R.** Aqueous two-phase metal affinity partitioning protein purification system. (US 5907035). 1997. (a *Baxter Biotech Technology Sari, Neuchatel, CH*).
32. **Guoqiang, D., Kaul, R., & Mattiasson** (1994) *Journal of Chromatography A* 668, 145.

33. **Gustafsson, S. J., Hedman, P. O., Ling, T. G. I., y Mattiasson, B. G.** (US 4579661). 1986. (a *Pharmacia AB*, Sweden).

34. **Hart, R.A., Lester, P.M., Reifsnnyder, D.H., Ogez, J.R., & Builder, S.E.** (1994) *Biotechnology* (N Y) 12, 1113.

35. **Hatti-Kaul, R.** (2000) in *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*, *Humana Press*, Totowa, New Jersey.

36. **Hayenga, K. J., Valax, y P.P.** Methods for protein purification using aqueous two-phase extraction. (US 6437101). 1999. (a *Akzo Nobel N.V., Arnhem, NL*).

37. **Haynes, C.A., Beynon, R.A., King, R.S., Blanch, H.W., & Prausnitz, J.M.** (1989a) *Journal of Physical Chemistry* 93, 5612.

38. **Haynes, C.A., Blanch, H.W., & Prausnitz, J.M.** (1989b) *Fluid Phase Equilibria* 53, 463.

39. **Heinsohne, H. G. y Hayenga, K. J.** (EU 0 477284 B1). **1995**. (a *Smithkline Biologicals*).

40. **Heinsohne, H. G., Lorch, J. D., y Arnold, R. E.** (US 5139943). 1992. (a *Genecor International, Inc.*).

41. **Johansson, G. & Reczey, K.** (1998) *Journal of Chromatography B* 711, 161.

42. **Kim, C. Y., Farver, T. F., y Brewer, J. W.** (US 4508825). 1985. (a *Miles Laboratories, Inc.*).

43. **Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA.** Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1190-1195.

44. **King, R.S., Blanch, H.W., & Prausnitz, J.M.** (1988) *American Institute of Chemical Engineers Journal* 34, 1585.

45. **Kirchberger, J., Kopperschläger, G., Rockstroh, M., y Eisenbrandt, K.** (DD 298 424). 1992. (a *Universitat Leipzig, Germany*).

46. **Lee, C. J. y Khan, P.** (US 5407579). 1995. (a *National Science Concil, Taipei*).

47. **Li, Y. & Beitle, R.R.** (2002) *Biotechnol. Prog.* 18, 1054.

48. **Lorch, J. D., Clarkson, E., Larenas, B. S., Bower, B. S, y Weiss, G. L.** (US 5328841). 1994. (a *Genecore International, Inc.*).

49. **Menge, U., Fraune, E., Lehmann, J., & Kula, M.R.** (1987) *Dev Biol Stand* 66, 391.

50. **Menge, U., Morr, M., y Kula, M. R.** (DE 2943026 C2). 1984. (a *the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH*).

51. **Minami, N.M. & Kilikian, B.V.** (1997) *Journal of Chromatography* 711, 309.

52. **Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, y Rubinstein, M** (1999). *Immunity* 10, 127-136.

53. **Paul, F., Monsan, P., y Auriol, D.** (US 4591563). 1986. (a *Societe Nationale Elf Aquitaine, France*).

54. **Pearson,** *Methods Enzymol.* 1990; 183:63-98

55. **Persson, J., Johansson, H.O., & Tjemeld, F.** (1999) *Journal of Chromatography A* 864, 31.

56. **J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, y G. Belfrage,** *Nature* (London) 258, 598-599 (1975)

57. **J. Porath y B. Olin,** *Biochemistry* 22, 1621-1630 (1983)

58. **Puren et al.,** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Mar 2; 96(5):2256-61.

59. **Schütte, H., Hummel, W., & Kula, M.R.** (1984) *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 167.

60. **Schütte, H., Hummel, W., Tsai, H., & Kula, M.R.** (1985) *Applied Microbiology and Biotechnology* 22, 306.

ES 2 313 367 T3

61. **Sieron, R., Wondraczek, R., Binder, K., Dittmar, H., Lambrecht, K., y Thessa, H.** (DD 288837). 1994. (a *Zentralinstitut für Mikrobiologie and experimentelle Therapie*).

62. **Suzuki, M., Kamihira, M., Shiraishi, T., Takeuchi, H., & Kobayashi, T.** (1995) *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 78.

63. **Tjemeld, F. & Johansson, G.** (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 30, 809-816.

64. **Tjemeld, F., Persson, J., y Johansson, H. O.** Separation method utilizing liquid-liquid partition. (US 6454950). 2002. (a *Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE*).

65. **Urushihara, J** *Pediatr Surg.* 2000 Mar; 35(3):446-9.

66. van **Wijnendaele, F., Gilles, D., y Simonet, G.** (EU 0199698 B1). 1991. (a *Smithkline Biologicals S.A.*).

67. **Vigers et al.,** *Nature.* 1997 Mar 13; 386(6621):190-4.

68. **Walter, H., Brooks, D.E., & Fisher, D.** (1985) in Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology, *Academic Press*, Orlando, Fla.

69. **Zaslaysky, B.Y.** (1995b) in Aqueous Two-Phase Partitioning (Zaslaysky, B.Y., Ed.) pp 503-667, *Marcel Dekker, Inc.*, New York, Basel, Honk Hong.

70. **Zaslaysky, B.Y.** (1995a) in Aqueous Two-Phase Partitioning (Zaslaysky, B.Y., Ed.) pp 75-152, *Marcel Dekker, Inc.*, New York, Basel, Honk Hong.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar IL-18BP de un fluido, que comprende al menos una etapa usando reparto 4 de dos fases acuosas, en el que el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal que comprende $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ o $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$.

2. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el PEG tiene un peso molecular variable entre 2.000 y 12.000.

3. El procedimiento según las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que el PEG tiene un peso molecular de 10.000.

4. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración inicial de $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ es menos del 20% [p/p] o el 14% [p/p] o el 12% [p/p] o el 10% [p/p] o el 8% [p/p] o el 6% [p/p] o el 4% [p/p] o el 2% [p/p].

5. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que el PEG se usa en una concentración de menos del 35% [p/p] o el 30% [p/p] o el 25% [p/p] o el 20% [p/p] o el 15% [p/p] o el 12% [p/p] o el 10% [p/p] o el 5% [p/p].

6. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,5108x + 35,159$$

en la que y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

7. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,5573x + 35,757$$

en la que y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

8. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que las concentraciones de las dos fases se calculan según la siguiente fórmula:

$$y = -2,1182x + 35,355$$

en la que y = PEG en % [p/p] y x = $(\text{Na}_2)\text{SO}_4$ en % [p/p].

9. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento se realiza a un pH variable entre pH 4 y 9.

10. El procedimiento según la reivindicación 9ª, en el que se realiza a pH 5.

11. El procedimiento según la reivindicación 9ª, en el que se realiza a pH 7.

12. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento se realiza a temperatura ambiente.

13. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa que usa un sistema de dos fases acuosas es una etapa de captura.

14. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más etapas de purificación adicionales.

15. El procedimiento según la reivindicación 14ª, en el que las etapas de purificación adicionales se seleccionan entre cromatografía de afinidad de ion de metal, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase inversa.

16. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más etapas de ultrafiltración.

17. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más etapas de filtración para separación de virus.

ES 2 313 367 T3

18. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido se selecciona entre cosecha de cultivo de células, lisado de células, extracto de células, extracto de tejidos, plasma sanguíneo, suero, leche, orina, ascites, extracto de plantas o una fracción derivada de una etapa de purificación de proteína anterior.

5 19. El procedimiento según la reivindicación 18^a, en el que la cosecha de cultivo de células es cosecha de cultivo de células cruda no clarificada.

10 20. El procedimiento según la reivindicación 18^a, en el que la cosecha de cultivo de células es cosecha de cultivo de células cruda clarificada.

21. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 18^a a 20^a, en el que la cosecha de cultivo de células se deriva de células de ovario de hámster chino (CHO).

15 22. El procedimiento según la reivindicación 21^a, en el que las células CHO se desarrollan en suspensión.

23. El procedimiento según alguna de las reivindicaciones precedentes, en el que la IL-18BP es IL-18BP recombinante humana.

20 24. El uso de un sistema de dos fases acuosas para la purificación de IL-18BP, en el que el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal que comprende (NH₄)SO₄ o (Na₂)SO₄.

25 25. El uso de un sistema de dos fases acuosas para la captura de IL-18BP de un fluido, en el que el sistema de dos fases acuosas comprende una fase de polietilenglicol (PEG) y una fase de sal que comprende (NH₄)SO₄ o (Na₂)SO₄.

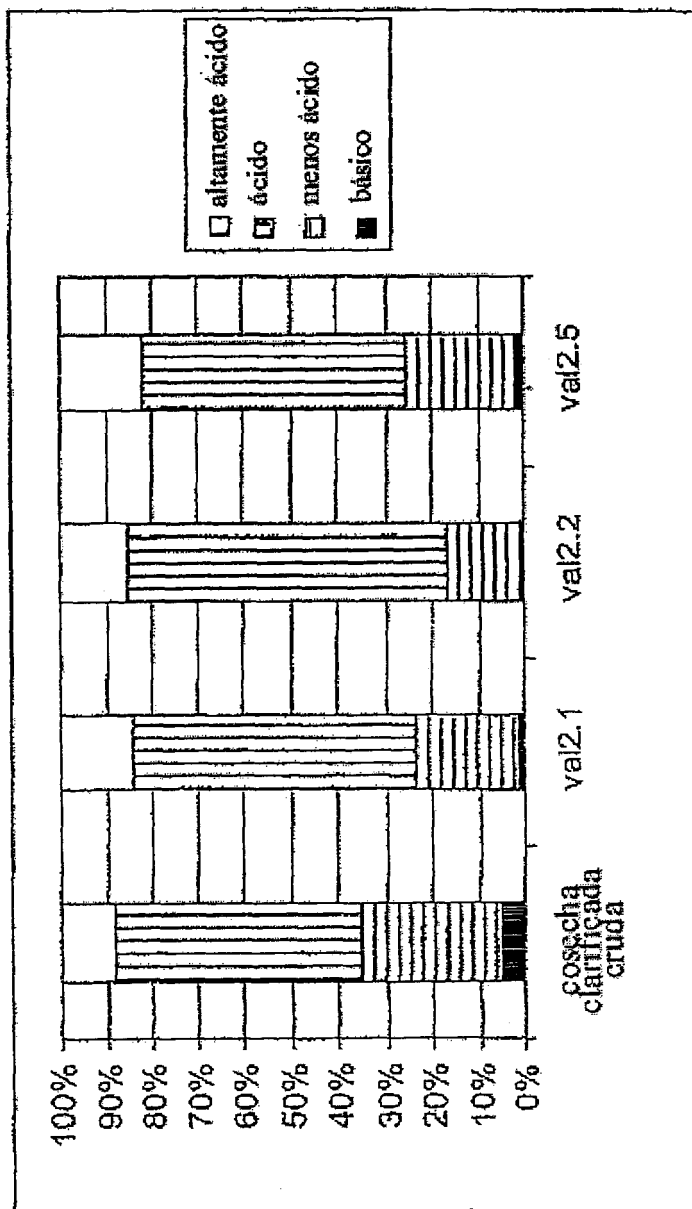


Fig. 1

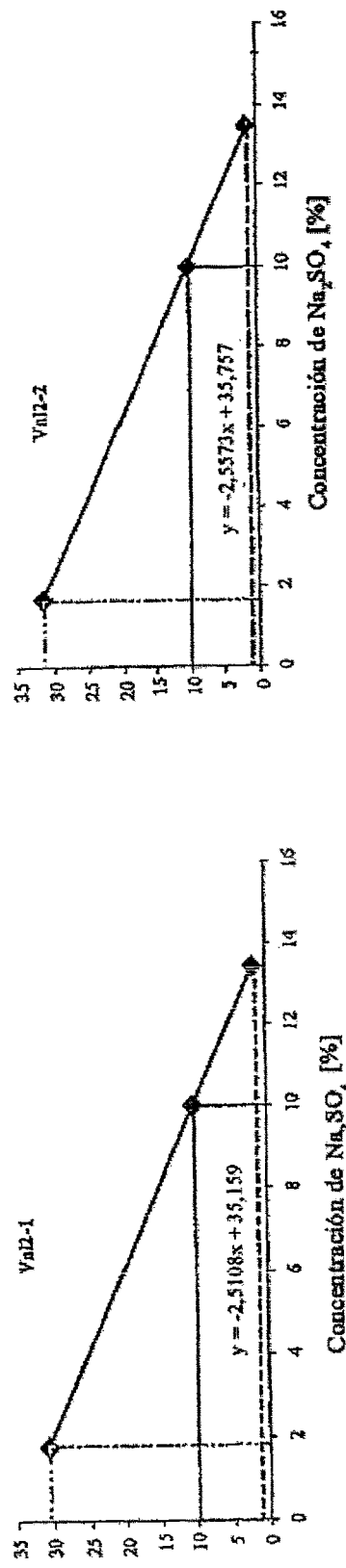


Fig. 3

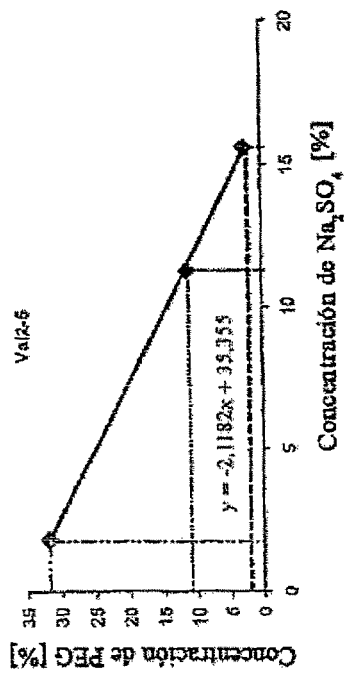


Fig. 2

