



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 091**

51 Int. Cl.:
C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07021006 .7**

96 Fecha de presentación : **29.10.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1900751**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Purificación por afinidad de polipéptido en una matriz de proteína.**

30 Prioridad: **27.11.1996 US 31500 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2010

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Blank, Greg S.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 337 091 T3

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

Purificación por afinidad de polipéptido en una matriz de proteína.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención está generalmente relacionada con la purificación de proteínas. En particular, la invención está relacionada con un procedimiento para purificar proteínas que contienen una región C_H2/C_H3, a través de cromatografía de afinidad con Proteína A.

Descripción de la técnica relacionada

La purificación económica de proteínas, a gran escala, se está convirtiendo en un problema de creciente importancia para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas son producidas a través de cultivo celular, utilizando o bien líneas celulares bacterianas o de mamífero, diseñadas para producir la proteína de interés, por medio de la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, las mismas tienen que ser alimentadas con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores del crecimiento, suministrado habitualmente a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos proporcionada como alimento a las células y de los subproductos de las propias células hasta lograr un grado de pureza suficiente para un uso terapéutico constituye un desafío formidable.

Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de residuos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Se puede lograr el que algunas proteínas sean secretadas directamente desde la célula en el medio de crecimiento del entorno; otras se obtienen intracelularmente. Para estas últimas, la primera etapa de un procedimiento de purificación conlleva la lisis de la célula, la cual puede ser efectuada a través de una diversidad de procedimientos, incluyendo la rotura mecánica, el shock osmótico o los tratamientos enzimáticos. La citada interrupción libera el contenido completo de la célula en el homogenado y, además, genera fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos son generalmente eliminados a través de centrifugación diferencial o a través de filtración. El mismo problema surge, aunque a escala más pequeña, con las proteínas directamente secretadas, debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas de célula huésped intracelular en el transcurso del proceso de producción de la proteína.

Una vez se ha obtenido una solución clara que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula es habitualmente intentada utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas en base a su carga, a su grado de hidrofobicidad o su tamaño. Para cada una de estas técnicas se dispone de diversas resinas cromatográficas, las cuales permiten la adaptación ajustada del esquema de purificación a la proteína involucrada en particular. La esencia de cada uno de estos procedimientos de separación reside en el hecho de que las proteínas pueden ser o bien desplazadas en sentido descendente, a diferentes velocidades, a lo largo de una columna larga, lográndose una separación física que se incrementa a medida que desciende adicionalmente por la columna, o bien adherirse selectivamente al medio de separación, siendo después eluidas diferencialmente a través de diferentes disolventes. En algunos casos, la proteína seseada es separada de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "eluido".

La cromatografía por afinidad, la cual explota una interacción específica entre la proteína que tiene que ser purificada y un agente de captura inmovilizado, puede constituir también una opción para algunas proteínas. La Proteína A en un adsorbente de utilidad para la cromatografía por afinidad de proteínas, tales como anticuerpos, que contienen una región Fc. La Proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD, procedente de *Staphylococcus aureus*, la cual se une con elevada afinidad (aproximadamente 10⁻⁸ M para IgG humana) a la región Fc de anticuerpos.

Resumen de la invención

Un problema asociado a la cromatografía con Proteína A de preparaciones de proteínas contaminadas ha sido identificado en el presente documento. En particular, se ha observado que en la cromatografía con Proteína A que utiliza una superficie de sílice o de vidrio para la adsorción de la Proteína A (por ejemplo, cuando la Proteína A es inmovilizada sobre una columna de vidrio de poro controlado o sobre una columna de ácido silícico), los contaminantes en la preparación proteínica (tal como proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP), en la que la preparación proteínica procede de una célula CHO), se adhieren a la superficie de sílice o de vidrio de la fase sólida. Se observó que esto ocurría incluso cuando la fase sólida estaba revestida con un reactivo (tal como glicerol) en un intento por evitar la adherencia no específica a la misma. Para solucionar este problema en el presente caso, se ha pensado en una etapa de lavado intermedia. Esta etapa de lavado sirve para eliminar los contaminantes, pero no la Proteína A inmovilizada o la proteína de interés unida a la Proteína A, procedente de la fase sólida. En particular, se ha observado que en esta etapa de lavado intermedia pueden utilizarse electrolitos hidrófobos, cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio.

Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para la purificación de una proteína a partir de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía con proteína A, en el que dicha proteína a purificar comprende una región C_H2/C_H3 fusionada a, o conjugada con un polipéptido seleccionado del grupo de renina; una hormona del crecimiento; factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroides; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; un factor de coagulación; un factor anti-coagulación; factor natriurético atrial; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno; bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoietico; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-alfa); una albúmina de suero; sustancia inhibidora Muelleriana, cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana; DNAsa, IgE; un antígeno citotóxico asociado a linfocito T (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un receptor para hormona o factor de crecimiento; o D; un factor reumatoide; un factor neurotrófico; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto; factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF); Factores I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) e (IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; una proteína CD; eritropoyetina; un factor osteoinductivo; una inmunotoxina; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón; un factor estimulador de colonias (CSFs); una interleuquina; superóxido dismutasa; un receptor de células T; una proteína de membrana de superficie; un factor acelerador de la degradación; un antígeno viral; una proteína de transporte; un receptor "homing"; una adhesina; una proteína reguladora; una integrina; un antígeno asociado a tumor; o un fragmento de cualquier uno de los polipéptidos indicados anteriormente; comprendiendo el método las siguientes etapas realizadas de manera secuencial: (a) adsorber la proteína en la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida que comprende sílice o vidrio; (b) eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida mediante lavado de la fase sólida con un disolvente de electrolito hidrófobo, en donde el disolvente de electrolito hidrófobo comprende cloruro de tetrapropilamonio, cloruro de tetrabutilamonio, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) o cloruro de tetraetilamonio (TEAC); y (c) recuperar la proteína a partir de la fase sólida.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Cuando se utiliza en el presente documento, el término "Proteína A" abarca la Proteína A recuperada a partir de una de sus fuentes de origen natural, la Proteína A producida de forma sintética (por ejemplo, mediante síntesis peptídica o a través de técnicas recombinantes), y variantes de la misma que retienen la capacidad de unión a proteínas que tienen una región C_H2/C_H3 . La Proteína A puede ser adquirida comercialmente en Repligen, Pharmacia y Fermatech.

La Proteína A es inmovilizada sobre una fase sólida. Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la cual puede adherirse la Proteína A. La fase sólida de interés en el presente documento es una que comprende una superficie de sílice o de vidrio. La fase sólida puede ser una columna de purificación o una fase discontinua de partículas discretas. En realizaciones preferidas, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En determinadas realizaciones, la fase sólida está revestida con un reactivo (tal como glicerol), el cual pretende evitar la adherencia no específica de contaminantes a la fase sólida.

La proteína de interés en el presente documento es una que comprende una región C_H2/C_H3 y, por tanto, es susceptible de ser purificada por medio de cromatografía con Proteína A. El término "región C_H2/C_H3 ", cuando se utiliza en el presente documento, hace referencia a aquellos restos de aminoácido en la región Fc de una molécula inmunoglobulina que interaccionan con la proteína A. En realizaciones preferidas, la región C_H2/C_H3 comprende una región C_H2 intacta seguida de una región C_H3 intacta y, muy preferiblemente, comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Entre los ejemplos de proteínas que contienen una región C_H2/C_H3 se incluyen anticuerpos, inmunoadhesinas y proteínas de fusión que comprende una proteína de interés fusionada o conjugada con una región C_H2/C_H3 .

La "etapa de lavado intermedia" es una etapa llevada a cabo después de que la proteína de interés es depositada sobre la fase sólida y adsorbida a la Proteína A, pero antes de que la proteína sea recuperada desde la columna. La etapa de lavado intermedia sirve para eliminar contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida, sin eluir significativamente la proteína de interés desde la fase sólida. En la etapa de lavado intermedia, la fase sólida es lavada con un disolvente de electrolito hidrófobo (por ejemplo, el disolvente de electrolito hidrófobo es hecho pasar a través de la columna con Proteína A, en la que la fase sólida es una columna).

El "disolvente de electrolito hidrófobo" en la etapa de lavado intermedia es aquel que es capaz de eluir contaminantes unidos a la fase sólida, sin eluir significativamente la Proteína A inmovilizada u otra proteína de interés adsorbida por la misma. Preferiblemente, el disolvente de electrolito hidrófobo es un soporte acuoso (por ejemplo, un tampón), que comprende uno o más electrolitos hidrófobos. Los electrolitos hidrófobos son alquilaminas, cloruro de tetrametilamonio (TEMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio.

Un "tampón" es una solución tamponada que resiste cambios en el pH a través de la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El "tampón de equilibrio" en el presente documento es aquel utilizado para preparar la fase sólida (con Proteína A inmovilizada) para cargar la proteína de interés. El tampón de equilibrio es preferiblemente isotónico y habitualmente tiene un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. El tampón de

equilibrio del ejemplo era Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1. El “tampón de carga” es aquel que es utilizado para cargar la mezcla de la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 y los contaminantes sobre la fase sólida en la que se encuentra inmovilizada la Proteína A. A menudo, los tampones de carga y de equilibrio son los mismos. El “tampón de elución” se utiliza para eluir la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 a partir de la Proteína A inmovilizada. Preferiblemente, el tampón de elución tiene un pH bajo y debido a ello interrumpe interacciones entre la Proteína A y la proteína de interés. Preferiblemente, el tapón de elución a pH bajo tiene un pH comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, muy preferiblemente en la banda comprendida entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4. Entre los ejemplos de tampones que controlarán el pH dentro de esta banda se incluyen tampones fosfato, acetato, citrato y amonio, al igual que combinaciones de los mismos. Los tampones preferidos de entre los anteriores son los tampones citrato y acetato, muy preferiblemente citrato sódico o acetato sódico. Se contemplan otros tampones de elución, incluyendo tampones de pH elevado (por ejemplo, aquellos que tienen un pH de 9 ó superior) o tampones que comprenden un compuesto o una composición tal como $MgCl_2$ (2 mM) para eluir la proteína de interés.

El término “anticuerpo” se utiliza en su sentido más amplio y, específicamente, cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, en la medida en la que los mismos retienen o son modificados para comprender una región C_H2/C_H3 , tal y como se ha definido en el presente documento.

“Fragmentos de anticuerpo” comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o la región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; moléculas anticuerpo de cadena única; dianticuerpos; anticuerpos lineales y anticuerpos multispecíficos formados con fragmentos de anticuerpo.

El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, a saber, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, excepto en lo que hace referencia a las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales resultan ser altamente específicos, siendo dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada uno de los anticuerpos monoclonales va dirigido contra un determinante único sobre el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no tiene que ser construida en el sentido de requerir la producción del anticuerpo a través de cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que tienen que ser utilizados según la presente invención pueden ser preparados a través del procedimiento hibridoma descrito primeramente por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o ser obtenidos por medio de procedimientos de DNA recombinante (ver, por ejemplo, la patente USA nº. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden ser también aislados a partir de librerías de anticuerpo de fago, utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los presentes anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas), en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, al igual que fragmentos de los citados anticuerpos, en tanto en cuanto los mismos muestren la actividad biológica deseada (patente USA nº. 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

El término “región hipervariable”, cuando se utiliza en el presente documento, hace referencia a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido procedentes de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (a saber, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) y/o aquellos restos procedentes de un “bucle hipervariable” (a saber, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Restos “marco” o “FR” son aquellos restos de dominio variable diferentes de los restos de región hipervariable descritos en el presente documento.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores), en las cuales restos de región hipervariable son sustituidos por restos de región hipervariable procedentes de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos (FR) de región marco Fv de inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no son encontrados en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son efectuadas para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, habitualmente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles

hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de la secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la que corresponde a la inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan el “dominio de unión” de una proteína “adhesina” heteróloga (por ejemplo, un receptor, ligando o enzima), con las funciones efectoras de un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácido de adhesina con la especificidad de unión deseada, que es diferente a la de reconocimiento de antígeno y de sitio de unión (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (a saber, es “heteróloga”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoglobulina es preferiblemente derivada de cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ó $\gamma 4$, dado que las inmunoadhesinas que comprenden estas regiones pueden ser purificadas mediante cromatografía con Proteína A (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)).

El término “dominio de unión a ligando”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier receptor de superficie celular de origen natural o a cualquier región o derivado de las mismas que retiene al menos una unión a ligando cualitativa de un receptor de origen natural correspondiente. En una realización específica, el receptor procede de un polipéptido de la superficie celular que tiene un dominio extracelular que es homólogo a un componente de la superfamilia de inmunoglobulina. Otros receptores, que no son componentes de la superfamilia de inmunoglobulina pero que están no obstante cubiertos por esta definición, son receptores para citoquinas y, en particular, receptores con actividad tirosina-quinasa (receptores de tirosina-quinasa), componentes de las superfamilias hematopoyetina y de los receptores del factor de crecimiento y moléculas de adherencia celular, por ejemplo, selectinas (E, L, y P).

El término “dominio de unión a receptor”, se utiliza para designar cualquier ligando de origen natural para un receptor, incluyendo moléculas de adherencia celular, o cualquier región o derivado del citado ligando de origen natural que retiene al menos una capacidad de unión a receptor cualitativa de un ligando de origen natural correspondiente. Esta definición, entre otras, incluye especialmente secuencias de unión procedentes de ligandos para los receptores mencionados anteriormente.

Una “quimera anticuerpo-inmunoadhesina” comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal y como se ha definido en este documento), con al menos una inmunoadhesina (tal y como se ha definido en esta solicitud). Entre las quimeras anticuerpo-inmunoadhesina ejemplarizadas se encuentran las quimeras CD4-IgG biespecíficas, descritas en Berg *et al.*, PNAS (USA) 88: 4723-4727 (1991) y Chamow *et al.*, J. Immunol. 153: 4268 (1994).

Procedimientos para llevar a cabo la invención

El procedimiento del presente documento implica la purificación de contaminantes de una proteína que contiene una región C_H2/C_H3 por medio de cromatografía con Proteína A. La proteína que tiene que ser purificada utilizando cromatografía con Proteína A es una proteína fusionada a, o conjugada con, una región C_H2/C_H3 según la reivindicación 1. Las técnicas para la generación de las citadas moléculas serán discutidas más adelante.

1. Proteínas de contienen la región C_H2/C_H3

La proteína que tiene que ser purificada es aquella que está fusionada a, o conjugada con una región C_H2/C_H3 . Las citadas proteínas de fusión pueden ser producidas con el fin de incrementar la vida media en suero de la proteína y/o para facilitar la purificación de la proteína por medio de cromatografía con Proteína A.

Entre los ejemplos de proteínas biológicamente importantes que pueden ser conjugadas de este modo se incluyen renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación del crecimiento, hormona paratiroide; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular, el factor de von Willebrands; factores anti-coagulación tales como Proteína C; factor natriurético atrial, tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético, factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-alfa); una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora Muelleriana, cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelinaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNAsa, IgE; un antígeno citotóxico asociado a linfocito T (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5 ó NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$, TGF-

$\beta 4$ 6 TGF- $\beta 5$, Factores I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) e (IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta, y gamma; factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígenos virales, tales como, por ejemplo, una parte de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores "homing", adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; antígeno asociado a tumor, tales como receptores de HER2, HER3 ó HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

2. Purificación proteínica

La proteína que tiene que ser purificada utilizando el procedimiento descrito en el presente documento es producida generalmente utilizando técnicas recombinantes. En los documentos de patente de Estados Unidos nos. 5.534.615 y 4.816.567 se describen, por ejemplo, procedimientos para la producción de proteínas recombinantes. En realizaciones preferidas, la proteína de interés es producida en una célula CHO (ver, por ejemplo, WO 94/11026).

La Patente de Estados Unidos US5429746 describe la purificación de anticuerpos en Proteína A inmovilizada en esferas de vidrio de poro controlado. En la misma, la etapa de lavado se realiza a pH 7 utilizando tampón PBS/glicina.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la proteína puede ser producida de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretada directamente en el medio. Si la proteína es producida de forma intracelular, como primer paso, el residuo en forma de partícula, ya se trate de células huésped o de fragmentos sometidos a lisis, es eliminado, por ejemplo, por medio de centrifugación o ultrafiltración. Cuando la proteína es secretada en el medio, las células huésped recombinantes pueden ser separadas del medio de cultivo celular por medio, por ejemplo, filtración con flujo tangencial.

La Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida es utilizada para purificar la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 . La fase sólida es, preferiblemente, una columna que comprende una superficie de sílice o de vidrio para inmovilizar la Proteína A. Preferiblemente, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. A veces, la columna ha sido revestida con un reactivo, tal como glicerol, en un intento para evitar la adherencia no específica a la misma. La columna PROSEP ATM, disponible comercialmente en Bioprocessing Limited, constituye un ejemplo de una columna de vidrio de poro controlado de Proteína A que está revestida con glicerol.

La fase sólida para la cromatografía con Proteína A es equilibrada con un tampón adecuado. Por ejemplo, el tampón de equilibrio puede ser Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1.

La preparación contaminada derivada de las células huésped recombinantes es depositada sobre la fase sólida equilibrada, utilizando un tampón de carga que puede ser igual que el tampón de equilibrio. A medida que la preparación contaminada fluye a través de la fase sólida, la proteína es adsorbida por la Proteína A inmovilizada y, tal y como se ha indicado en el presente documento, otros contaminantes (tales como proteínas de Ovario de Hamster Chino, CHOP, en los que la proteína es producida en una célula CHO), se unen de forma no específica a la fase sólida.

La siguiente etapa llevada a cabo de forma secuencial comprende la eliminación de los contaminantes unidos a la fase sólida por medio del lavado de la fase sólida con un disolvente de electrolito hidrófobo en una etapa de lavado intermedia. En realizaciones preferidas, el electrolito hidrófobo en este disolvente de lavado es TEMAC y/o TEAC. Si bien puede encontrarse presente un único electrolito hidrófobo en el disolvente de lavado, en determinadas realizaciones, pueden utilizarse dos o más de dichos electrolitos. El electrolito hidrófobo se añade preferiblemente a una solución tamponada de pH que tiene un pH en el intervalo entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 y, preferiblemente, en la intervalo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. Entre los tampones adecuados para este propósito se incluyen tampones Tris, fosfato, MES y MOPSO. La concentración final preferida para el electrolito hidrófobo en el disolvente de lavado se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 M y, preferiblemente, en el intervalo entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,5 M.

Después de la etapa de lavado intermedia del párrafo precedente, la proteína de interés es recuperada de la columna. Esto se logra habitualmente utilizando un tampón de elución adecuado. La proteína puede, por ejemplo, ser eluida de la columna utilizando un tampón de elución que tiene un pH bajo, por ejemplo, comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 y, preferiblemente, en la banda comprendida entre aproximadamente 2,5 y 3,5. Entre los ejemplos de tampones de elución adecuados a tal efecto se incluyen los tampones acetato y citrato.

La preparación de proteína eluida puede ser sometida a etapas de purificación adicionales, ya sea con anterioridad a o con posterioridad a la cromatografía por afinidad, utilizando un anticuerpo para capturar la proteína; cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); precipitación con sulfato amónico; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice; cromatofocalización y filtración en gel.

La proteína recuperada de este modo puede ser formulada en un soporte farmacéuticamente aceptable y es utilizada para diversos usos en diagnóstico, terapéutica o en otros usos conocidos para las citadas moléculas.

Ejemplo 1

La columna PROSEP A™ (Bioprocessing, Ltd) tiene Proteína A inmovilizada sobre una columna de vidrio de poro controlado revestida con glicerol. El revestimiento de glicerol reduce la superficie de vidrio disponible para interacciones no específicas con contaminantes pero, tal y como se demuestra en el presente documento, los contaminantes todavía pueden adherirse a la columna.

La cromatografía con Proteína A era la etapa inicial cromatográfica en la purificación de la proteína que contienen la región C_H2/C_H3; anticuerpo anti-HER2 humanizado (humAb4D5-8) (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4285-4289 (1992). Este anticuerpo anti-HER2 fue producido de forma recombinante en células CHO. Después de la producción y secreción de proteína en el medio de cultivo celular, las células CHO fueron separadas del medio de cultivo celular a través de filtración con flujo tangencial (PROS-TACK™). En este sistema de expresión, los contaminantes más prevalentes fueron encontrados en las Proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP).

La columna PROSEP A™ fue equilibrada con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1 (Tampón A). Se llevó a cabo una cromatografía con Proteína A, mediante la aplicación del fluido de cultivo celular recolectado (HCCF) procedente de las células CHO, directamente hacia la columna PROSEP A™ equilibrada, utilizando Tampón A como tampón de carga. La columna fue después lavada con Tampón A para eliminar por lavado las proteínas no unidas y el HCCF. El anticuerpo anti-HER2 fue eluido de la columna de Proteína A mediante lavado de la columna con Tampón B, que tiene un pH bajo (2,5-3,5). El Tampón B era una solución de citrato sódico 25 mM, pH 2,8. El bajo pH del tampón B interrumpía las interacciones entre la Proteína A y el anticuerpo anti-HER2. También interrumpía las interacciones no específicas entre las superficies de cristal expuestas de la columna y el CHOP contaminante no unido específicamente. Esto dio lugar a un nivel de contaminación de CHOP en la agrupación de proteína que contiene anti-HER2 eluido de aproximadamente 4.000 ppm (tabla 1).

TABLA 1

Muestra	Condiciones	CHOP	
		(µg/ml)	(ppm)
HCCF	Carga	760	1.461.538
Agrupación de anticuerpo	Sin lavado	32	4.270
Agrupación de anticuerpo	TMAC, lavado pH 5,0	3	408
Agrupación de anticuerpo	TEAC, lavado pH 5,0	2	317
Agrupación de anticuerpo	TMAC, lavado pH 7,1	4	537
Agrupación de anticuerpo	TEAC, lavado pH 7,1	5	620
^a El tampón de lavado era Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, incluyendo o bien TMCA 0,5 M o TEAC, al pH indicado. Después del lavado, la proteína fue eluida a pH 2,8			

Con vistas a solucionar este problema que concierne a los contaminantes en la agrupación de proteína eluida, se evaluó una “etapa de lavado intermedia”. Con anterioridad a la elución del anticuerpo de la columna, la columna con Proteína A fue lavada con tampón de lavado (a diferentes pHs), al cual se le añadieron concentraciones diversas de TMAC o TEAC (Tabla 1).

Tal y como se muestra en la Tabla 1, la etapa de lavado intermedio que utiliza un tampón que contiene o bien TMAC o TEAC resultaba eficaz en la reducción del nivel de CHOP en la agrupación de anticuerpo eluida. La concentración de o bien TMAC o TEAC resultaba preferiblemente inferior a 0,25 M. Por consiguiente, se averiguó que las concentraciones de TMAC o TEAC preferidas en el disolvente de lavado oscilan entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 M y, preferiblemente, entre aproximadamente 0,25 y 0,5 M.

ES 2 337 091 T3

En lo que hace referencia a las variaciones en el pH de la solución de lavado, se averiguó que cuanto más bajo era el pH mayor era la eliminación de CHOP en la etapa de lavado. No obstante, a pHs situados por debajo de 7,0, la proteína puede resultar también eluida durante la etapa de lavado. Por consiguiente, los pHs preferidos para la etapa de lavado intermedia se encuentran entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 y, preferiblemente, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4816567 A [0016] [0017] [0027]
- US 5534615 A [0027]
- WO 9411026 A [0027]
- US 5429746 A [0028]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Kohler *et al.* *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0016]
- Clackson *et al.* *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0016]
- Marks *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0016]
- Morrison *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0017]
- Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1991 [0018]
- Chothia; Lesk. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0018]
- Jones *et al.* *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0019]
- Riechmann *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0019]
- Presta. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0019]
- Lindmark *et al.* *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0020]
- Berg *et al.* *PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 4723-4727 [0023]
- Chamow *et al.* *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 4268 [0023]
- Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0038]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de una proteína a partir de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía con proteína A, en el que dicha proteína a purificar comprende una región C_H2/C_H3 fusionada a, o conjugada con un polipéptido seleccionado del grupo de renina; una hormona del crecimiento; factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroides; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; un factor de coagulación; un factor anti-coagulación; factor natriurético atrial; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno; bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-alfa); una albúmina de suero; sustancia inhibidora Muelleriana, cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana; DNAsa, IgE; un antígeno citotóxico asociado a linfocito T (CTLA); inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un receptor para una hormona o un factor de crecimiento; proteína D; un factor reumatoide; un factor neurotrófico; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF); Factores I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) e (IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; una proteína CD; eritropoyetina; un factor osteoinductivo; una inmunotoxina; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón; un factor estimulador de colonias (CSFs); una interleuquina; superóxido dismutasa; un receptor de células T; una proteína de membrana de superficie; un factor acelerador de la degradación; un antígeno viral; una proteína de transporte; un receptor "homing"; una adreína; una proteína reguladora; una integrina; un antígeno asociado a tumor; o un fragmento de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente; comprendiendo el método:

(a) adsorber la proteína en la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida que comprende sílice o vidrio;

(b) eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida mediante lavado de la fase sólida con un disolvente de electrolito hidrófobo, en donde el disolvente de electrolito hidrófobo comprende cloruro de tetrapropilamonio, cloruro de tetrabutilamonio, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) o cloruro de tetraetilamonio (TEAC); y

(c) recuperar la proteína a partir de la fase sólida.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o es un fragmento del mismo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un receptor para una hormona o un factor de crecimiento, o es un fragmento del mismo, y la hormona o el factor de crecimiento es VEGF.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una hormona de crecimiento seleccionada entre la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina, o es un fragmento de cualquiera de ellas.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un factor de coagulación seleccionado entre el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular, y el factor de von Willebrands, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un factor anticoagulación que es la proteína C, o un fragmento de la misma.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un activador de plasminógeno seleccionado entre uroquinasa, orina humana, y activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA), o es un fragmento de cualquiera de ellos.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una albúmina de suero que es una albúmina de suero humano, o es un fragmento de la misma.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una proteína microbiana que es beta-lactamasa, o es un fragmento de la misma.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un CTLA que es CTLA-4, o es un fragmento del mismo.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un factor neurotrófico seleccionado entre el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5 ó NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el polipéptido es un factor de crecimiento nervioso que es NGF-β, o es un fragmento del mismo.

13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un factor de crecimiento de fibroblasto que es aFGF o bFGF, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un TGF seleccionado entre TGF-alfa o TGF-beta, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el polipéptido es un TGF-beta seleccionado entre TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, y TGF- β 5, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una proteína CD seleccionada entre CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20, o es un fragmento de cualquiera de ellas.

17. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un interferón seleccionado entre interferón-alfa, -beta, y -gamma, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

18. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un CSF seleccionado entre M-CSF, GM-CSF y G-CSF, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

19. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una IL seleccionada entre cualquiera de IL-1 a IL-10, o es un fragmento de cualquiera de ellas.

20. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un antígeno viral que es una parte de la envoltura de VIH, o es un fragmento del mismo.

21. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una integrina seleccionada entre CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 y VCAM, o es un fragmento de cualquiera de ellas.

22. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un antígeno asociado a tumor seleccionado entre un receptor HER2, receptor HER3 y un receptor HER4, o es un fragmento de cualquiera de ellos.

23. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado.

24. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una columna de ácido silícico.

25. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los contaminantes son proteínas de ovario de hámster chino (CHOP).

26. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración del electrolito hidrófobo en el disolvente de electrolito hidrófobo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 M.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que la concentración del electrolito hidrófobo en el disolvente de electrolito hidrófobo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 M.

28. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH del disolvente de electrolito hidrófobo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8.

29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que el pH del disolvente de electrolito hidrófobo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7.

30. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende eluir la proteína utilizando un tampón de elución que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que la etapa (c) comprende eluir la proteína utilizando un tampón de elución que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5.