



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 507**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/60 (2006.01)
A01N 43/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00928866 .3**
86 Fecha de presentación : **04.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1194445**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

54 Título: **Métodos para purificación de proteínas recombinantes antagonistas de la hormona del crecimiento utilizando extracción acuosa en dos fases.**

30 Prioridad: **07.05.1999 US 307549**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

73 Titular/es: **Diosynth RTP Inc.**
101 J. Morris Commons Lane
Morrisville, North Carolina 21560, US

72 Inventor/es: **Hayenga, Kirk, J. y**
Valex, Pascal, P.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Métodos para purificación de proteínas recombinantes antagonistas de la hormona del crecimiento utilizando extracción acuosa en dos fases.

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la purificación de proteínas recombinantes antagonistas de la hormona del crecimiento utilizando procedimientos de extracción líquido-líquido en dos fases.

2. Antecedentes de la invención

Las proteínas son componentes de los organismos vivos que juegan papeles críticos en fenómenos como metabolismo, expresión génica, transducción de señales, estructuras celulares y extracelulares, etcétera. Muchas proteínas son útiles para aplicaciones terapéuticas o diagnósticas; sin embargo, para utilizar las mismas terapéuticamente, es necesario preparar la proteína de interés en forma pura, es decir, sin contaminantes que podrían comprometer las metas terapéuticas o diagnósticas y poner potencialmente en peligro la salud de un paciente.

La purificación de las proteínas ha constituido un reto desde hace mucho tiempo, especialmente cuando se desea la purificación en gran escala, como se requiere típicamente para terapia o diagnósticos de grandes números de pacientes. Sin embargo, incluso cuando se desea la purificación de proteínas en pequeña o media escala, es muy deseable un procedimiento que sea rápido y fácil de realizar, al tiempo que proporcione la proteína de interés en forma suficientemente pura y con rendimientos altos.

La hormona del crecimiento humano ("hGH") y los antagonistas de hGH, es decir, los antagonistas de la hormona del crecimiento ("GHA"), son ejemplos de proteínas que son útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas. La hGH ha sido utilizada para el tratamiento del enanismo hipopituitario y todas las condiciones resultantes de niveles bajos de producción de hGH, esté causada dicha condición por defecto genético, lesión o hipofisectomía. Se ha demostrado también que la hGH mejora la recuperación de las víctimas de quemaduras y otros pacientes hospitalizados. Por otra parte, se ha utilizado GHA para tratar la acromegalia, una forma de gigantismo causada por la producción excesiva de hGH. Otras posibles indicaciones médicas de GHA son la prevención de la retinopatía en los pacientes diabéticos, y el tratamiento de pacientes de cáncer con tumores que sobre-expresan receptores que fijan hormona del crecimiento (Clark *et al.*, 1996, documento WO 97/11178).

Aun cuando la secuencia de aminoácidos de hGH está fuertemente conservada, las moléculas de GH de los animales domésticos comunes no son activas en humanos. Únicamente la proteína extraída de las glándulas de primates superiores funciona en humanos. Como consecuencia, la hGH ha sido purificada originalmente a partir de glándulas hipófisis recuperadas de cadáveres. El método de purificación general implicaba la extracción de tejidos en condiciones alcalinas suaves (Jones *et al.*, 1979, J. Endocrinology 82: 77-86) o con ácido acético glacial caliente, seguida por una serie de fraccionamientos por pH, sulfato de amonio, precipitación con etanol o precipitación con polietilenglicol (Nordisk Insulinlab, 1978, BE 857327) y varios pasos cromatográficos. La misma se ha purificado también a partir de extracto bruto de hipófisis por cromatografía de inmunoadfinidad (Jonsdottir *et al.*, 1986, Mol. Cell Endocrinol. 46: 131-135).

Sin embargo, la hGH derivada de hipófisis ha sido asociada recientemente con cierto número de casos de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y ha sido retirada del mercado. Para evitar esta clase de problema, la hGH tenía que expresarse en diferentes sistemas. Al principio, la misma se aislaba del sobrenadante de cultivos de células de riñón de mono transformadas utilizando cromatografía de interacción hidrófoba (Lefort *et al.*, 1986, J. Chromatogr. 361: 209-216). hGH no sufre glicosilación y puede expresarse por tanto ventajosamente como producto recombinante en bacterias. De hecho, hGH ha sido expresada en *Bacillus subtilis* (Franchi *et al.*, 1991, J. Biotechnol. 18: 41-54) y en *Escherichia coli*. Se han utilizado varios métodos de extracción, dependiendo del estado de la proteína expresada. La hGH producida en la forma de cuerpos de inclusión fue extraída por solubilización en concentraciones elevadas de agentes caotrópicos tales como hidrocloreto de guanidina (Mukhija *et al.*, 1995, Gene 165: 303-306) o urea. Después del replegamiento, la proteína se separaba luego por precipitación a pH selectivo (Storrs *et al.*, 1990, documento EP 445099) o se cargaba directamente a una columna cromatográfica. La hGH expresada en forma soluble ha sido purificada a partir de la fracción periplásmica de *E. coli* por intercambio aniónico (Becker *et al.*, 1986, FEBS Lett. 204: 145-150) o a partir del lisado de células brutas por cromatografía de inmunoadfinidad (Jonsdottir *et al.*, 1996, *supra*) y cromatografía de intercambio iónico (Ettori *et al.*, 1992, J. Biotechnol. 25: 307-318).

Se ha empleado distribución acuosa en dos fases para separar proteínas de residuos celulares o para separar unas proteínas de otras. La extracción líquido-líquido está basada en la incompatibilidad entre dos polímeros en solución acuosa, o de un polímero y una sal presentes a concentración elevada. Esta incompatibilidad dará como resultado la formación de dos fases separadas de composiciones muy diferentes. Las moléculas de proteína se repartirán preferentemente en una fase o la otra, dependiendo de sus características (Diamond *et al.*, 1992, Advances in Biochem. Eng. Biotechn. 47: 89-135).

Se han aplicado procedimientos de extracción acuosa en dos fases a la purificación de hGH, pero tales procedimientos incluían siempre agentes caotrópicos que desnaturalizaban la hGH (Builder *et al.*, Patentes U.S. Núms. 5.407.810; 5.695.958; 5.723.310). Sin embargo, el uso de un agente caotrópico como, por ejemplo, urea, sales de guanidina o sales tiocianato para desnaturalizar la proteína hGH presenta desventajas críticas, especialmente cuando se utiliza el método de purificación en gran escala. Por ejemplo, dichos agentes caotrópicos aumentan el coste de la purificación de hGH, particularmente dado que el agente caotrópico tiene que estar disponible en una forma pura. Asimismo, una vez que la proteína hGH se desnaturaliza, la misma tiene que replegarse antes de la mayoría de los usos, especialmente antes de los usos terapéuticos, aumentando por tanto los pasos de procesamiento necesarios y reduciendo potencialmente la cantidad de proteínas biológicamente activas.

El coeficiente de reparto de hGH en un sistema bifásico ha sido utilizado para analizar la pureza de las preparaciones de hGH después de su purificación y antes de uso terapéutico. Sin embargo, no se han utilizado en ningún caso procedimientos de extracción bifásicos que no utilicen un agente caotrópico para purificar hGH o GHA (Heinsohn *et al.*, Patentes U.S. Núms. 5.139.943; 5.152.358; Lorch *et al.*, Patente U.S. No. 5.328.841).

Así pues, es sumamente deseable un método sencillo, rápido y eficaz en costes para aislar GHA utilizando extracción bifásica sin necesidad de un agente caotrópico.

La publicación Journal of Biotechnology 3, (1986) 207-219 describe estudios acerca de la eliminación de residuos celulares de *Escherichia coli* por extracción acuosa bifásica con polímeros. Las materias primas biológicas utilizadas eran homogeneizados congelados de células de *E. coli*, modificadas por ingeniería genética para producir hormona del crecimiento humano (hGH). Se utilizaban soluciones de PEG 4000 y fosfato de potasio en los estudios de transferencia de masa.

3. Sumario de la invención

La invención se refiere a métodos de extracción acuosa en dos fases, en los cuales no se utiliza agente caotrópico alguno, para la purificación de proteínas recombinantes y GHA (rGHA) de cualquier fuente.

En un aspecto de la presente invención, los métodos proporcionan extracción multifásica para el aislamiento de proteínas rGHA. En una realización preferida de la presente invención, los métodos de extracción multifásicos proporcionan la extracción en dos fases para el aislamiento de las proteínas rGHA. En otro aspecto de la presente invención, los métodos de extracción proporcionan la extracción en dos fases para el aislamiento de las proteínas rGHA. Dichos métodos de extracción utilizan PEG 4600 y sulfato de amonio como agente formador de fases.

En un aspecto de la presente invención, los métodos de extracción proporcionan el uso de tampón Tris, tampón de fosfato, tampón MES, tampón HEPES, tampón de citrato para el aislamiento de las proteínas rGHA. En una realización de la presente invención, los métodos de extracción utilizan como la fuente de las proteínas a purificar cualquier célula, tejido o animal, por ejemplo, células animales, células de insecto, células vegetales, bacterias gram-negativas, bacterias gram-positivas, hongos filamentosos, levadura o animales transgénicos, o un extracto de un sobrenadante derivado de uno cualquiera de los anteriores. En una realización preferida, se utilizan células de *Escherichia coli*. Los métodos de extracción descritos en esta memoria no utilizan un agente desnaturalizante de proteínas tal como un agente caotrópico.

En una realización específica a modo de ejemplo, los métodos de extracción de la invención utilizan PEG a concentraciones de aproximadamente 6% a aproximadamente 15% en peso por unidad de volumen en la mezcla de extracción para el aislamiento de las proteínas rGHA. Adicionalmente, los métodos de extracción utilizan sulfato de amonio a concentraciones de aproximadamente 6% a aproximadamente 15% en peso por unidad de volumen en la mezcla de extracción para el aislamiento de las proteínas rGHA. Los métodos de extracción se llevan a cabo a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 para el aislamiento de las proteínas rGHA.

Los métodos de extracción descritos en esta memoria pueden llevarse a cabo en pequeña escala partiendo de menos de aproximadamente 10 litros de volumen de mezcla de extracción para el aislamiento de hGH, rGHA o un homólogo de cualquiera de ellas. Los métodos de extracción pueden llevarse a cabo también en escala media de más de aproximadamente 10 litros y menos de aproximadamente 100 litros de volumen de mezcla de extracción para el aislamiento de las proteínas rGHA. En una realización preferida, los métodos de extracción de la invención se llevan a cabo en gran escala superior a aproximadamente 100 litros de volumen de mezcla de extracción para el aislamiento de las proteínas rGHA.

4. Breve descripción de los dibujos

La Figura I muestra un esquema de los métodos de extracción de la presente invención. El procedimiento de extracción representado comienza con la adición de PEG y una sal al lisado de células (esquina superior izquierda) dando como resultado la mezcla de extracción. A continuación, la mixtura se mezcla y centrifuga concienzudamente de tal modo que se formen dos fases fluidas de las cuales la fase ligera superior está enriquecida en la proteína de interés. La fase superior se retira (esquina superior derecha). A continuación, puede realizarse opcionalmente un paso de reextracción por adición en primer lugar de una solución de PEG al 40% a la fase pesada inferior remanente (esquina inferior derecha). La cantidad de la solución de PEG añadida es tal que, después de mezcladura y centrifugación de la segunda mixtura de extracción, se forma una fase ligera superior que es aproximadamente igual en volumen a la fase

ligera superior formada en la primera extracción. La segunda mixtura de extracción se mezcla y centrifuga luego dando como resultado una segunda fase ligera superior que está enriquecida en la proteína de interés cuando se compara con la fase pesada inferior.

5 La Figura 2A muestra un diagrama de fases para una mixtura de un polímero y una sal. Las líneas curvas, continua y quebrada, son curvas binodales. Las curvas binodales indican el conjunto de concentraciones del agente formador de fases para las cuales se produce la separación de fases. Cualquier punto en el dominio situado a la izquierda de la curva binodal representa un sistema monofásico. Cualquier punto situado a la derecha de la curva binodal representa un sistema bifásico. La línea recta, que pasa por los puntos a, b y c, es una línea de enlace, es decir, el coeficiente de reparto de la proteína se mantiene inalterado a medida que la composición de la mixtura cambia a lo largo de la línea de enlace. Todos los sistemas en la línea de enlace producen las mismas dos fases, cuyas composiciones están descritas por las intersecciones de la línea de enlace con la curva binodal. Las mezclas de reacción representadas bajo a, b y c, por encima del diagrama de fases, son ejemplos de los volúmenes de las fases a medida que la composición del sistema cambia a lo largo de la línea de enlace y las mezclas representadas corresponden a los puntos a, b y c a lo largo de la línea de enlace en el diagrama de fases. El rendimiento del procedimiento de extracción dependerá del coeficiente de reparto y del volumen de la fase diana recuperado, es decir, el rendimiento dependerá de la línea de enlace y de la posición del sistema sobre dicha línea de enlace. La Figura 2B muestra de qué modo puede desplazarse la posición de la curva binodal. Son varios los factores que influyen en la posición de la curva binodal. En el caso de sistemas PEG-sal, el peso molecular creciente de las cadenas de PEG desplazará la curva binodal hacia concentraciones de sal menores.

Las Figuras 3A-3C muestran cromatogramas HPLC C-4 RP de un sobrenadante de homogenizado de cultivo de células (Figura 3A) y después de extracción en dos fases utilizando PEG al 8% y sulfato de amonio al 10% a pH 8,0 (Figuras 3B y 3C). En los cromatogramas presentados en las Figuras 3A-3C, no se integró el pico vacío al cabo de aproximadamente 2 minutos. El pico vacío es el material que no fija la columna, que está constituido probablemente por proteínas muy pequeñas y productos de fermentación tales como colorante. La Figura 3A muestra un cromatograma en fase inversa C-4 que representa el material de partida para la extracción en dos fases. Esto representa células homogeneizadas en caldo de fermentación después que se han separado los sólidos por centrifugación (sobrenadante del homogeneizado). Puede apreciarse GHA al cabo de aproximadamente 15 minutos. Los picos restantes son proteínas de contaminación. La Figura 3B muestra un cromatograma que representa la fase superior diluida 5 veces, obtenida después de extracción en dos fases. El rendimiento de 313 $\mu\text{g/ml}$ es realmente $5 \times 313 \mu\text{g/ml}$, o sea 1,565 mg GHA/ml. GHA se eluye al cabo de aproximadamente 15 min. La pureza está representada por el cromatograma. La Figura 3C muestra un cromatograma que representa la fase de fondo sin diluir. La concentración es 58,8 $\mu\text{g/ml}$.

35 5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para el aislamiento de proteínas rGHA. Los detalles para la práctica de la invención se describen en las subsecciones que siguen.

40 5.1. Proteínas GHA

Los métodos de la presente invención son útiles para el aislamiento de proteínas rGHA (a las que se hace referencia colectivamente en lo sucesivo como "la proteína", a no ser que el contexto indique otra cosa).

45 Las secuencias de proteínas rGHA y variantes de las mismas han sido descritas en las Patentes U.S. Núms. 5.681.809; 5.350.836; todas las cuales se incorporan en esta memoria por referencia en su totalidad.

5.1.1. Fuentes de Proteínas GHA

50 Si bien GHA son proteínas relativamente pequeñas que pueden sintetizarse químicamente (v.g. véase Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y.), las mismas pueden producirse ventajosamente por tecnología de DNA recombinante utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la expresión de genes. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis, y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, volúmenes 1-3: (1989), y actualizaciones periódicas del mismo, y Ausubel *et al.*, compiladores, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. El DNA y RNA codificantes de cualquiera de las secuencias de nucleótidos arriba descritas pueden sintetizarse químicamente utilizando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M.J. compilador, IRL Press, Oxford.

60 Una diversidad de sistemas vectores de la expresión de hospedadores pueden utilizarse para expresar GHA. Los sistemas de expresión que pueden utilizarse para los propósitos de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias (v.g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con DNA recombinante de bacteriófago, DNA plasmídico o vectores de expresión de DNA de cósmidos que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica GHA; levadura (v.g., *Sacharomyces*, *Pichia*) transfectada con vectores recombinantes de expresión de levadura que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica GHA; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (v.g., baculovirus) que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica GHA; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (v.g., el virus del mosaico

de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transfectados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (v.g., el plásmido Ti) que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica GHA; o sistemas de células de mamífero (v.g., COS, CHO, BHK, 293, 3T3, U937) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (v.g., el promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (v.g., el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En los sistemas eucariotas, pueden utilizarse cierto número de sistemas de selección, que incluyen, pero sin carácter limitante, los genes de la timidina-quinasa del virus del herpes simplex (Wigler *et al.*, 1997, Cell 11: 223), la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), y la adenina-fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22, 817) que pueden emplearse en células tk⁻, hprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Asimismo, puede utilizarse la resistencia antimetabolitos como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 67: 3567; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1597); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicosido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30: 147).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse cierto número de vectores de expresión que dependen del uso propuesto para la proteína GHA. Las bacterias adecuadas para la práctica de la invención son bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En una realización preferida, la proteína se expresa en bacterias *Escherichia coli* ("*E. coli*") y se aísla subsiguientemente de las células utilizando un método de la presente invención. La proteína puede expresarse una célula procariota utilizando sistemas de expresión conocidos por los expertos en la técnica de la biotecnología. Sistemas de expresión útiles para la práctica de la presente invención se describen en las patentes U.S. Núms. 5.795.745; 5.714.346; 5.637.495; 5.496.713; 5.334.531; 4.634.677; 4.604.359 y 4.601.980.

Las células procariotas pueden cultivarse en una diversidad de condiciones conocidas por los técnicos expertos. En un aspecto de la presente invención, las células se cultivan en un medio adecuado para el crecimiento de tales células, por ejemplo, medio mínimo o medio completo (es decir, rico). El medio utilizado para cultivar las células no debería contener concentraciones de sales u otros productos químicos, por ejemplo, urea, que sean tan altas como para interferir con la distribución de la proteína o el polipéptido o con la formación de fases durante los métodos de extracción de la presente invención.

GHA puede expresarse también en animales transgénicos. Animales de cualquier especie, con inclusión, pero sin carácter limitante, de ratones, ratas, conejos, cobayos, cerdos, lechones, cabras, y primates no humanos, v.g., babuinos, monos, y chimpancés pueden utilizarse para generar animales transgénicos que expresan un transgén que codifica GHA.

5.2. Purificación por Extracción Acuosa en Dos Fases

Los métodos de la presente invención son útiles para la purificación de GHA a partir de una mezcla bruta que puede ser rica en contaminantes tales como, por ejemplo, extractos celulares. Las células que expresan la proteína pueden prepararse antes del procedimiento de purificación de una diversidad de modos. Por ejemplo, es posible preparar una pasta de células muertas congeladas, o pueden utilizarse células vivas que se congelan. O bien, pueden utilizarse directamente células vivas en el procedimiento de extracción.

Los métodos de la presente invención se refieren a extracción multifásica acuosa para la purificación de GHA. En una realización preferida de la presente invención, se lleva a cabo una extracción acuosa en dos fases. Si se purifica GHA a partir de células, las células se disgregan o se homogeneizan antes de la extracción de la proteína. El propósito para la disgregación u homogeneización de las células es liberar GHA a partir de las células. Una diversidad de maneras para disgregar u homogeneizar células de diverso origen son bien conocidas en la técnica, por ejemplo molinos de bolas, choque osmótico, y fractura por congelación. En un aspecto preferido de la invención, la fuente se disgrega o se homogeneiza por el uso de un microfluidizador. En otro aspecto preferido, se utiliza un homogeneizador de alta presión (v.g. un Niro). Si la proteína o el polipéptido se secreta de las células en las que se sintetiza, las células no tienen que lisarse, sino que la proteína o el polipéptido puede extraerse del fluido extracelular o del medio de cultivo, v.g., añadiendo directamente el agente formador de fases al fermentador.

De acuerdo con la presente invención, la proteína puede purificarse a partir de células, un homogeneizado de células, células disgregadas, una mezcla bruta obtenida después de la síntesis química de la proteína, o cualquier clase de mezcla que contenga la proteína de interés y contaminantes tales que sea deseable la purificación de la proteína. En un aspecto de la invención, la proteína se purifica a partir de una mezcla bruta por adición de reactivos que son capaces de formar un sistema multifásico acuoso, tal como, por ejemplo, un sistema bifásico. En una realización preferida, la mezcla de extracción se agita para disolver los agentes formadores de fases y mezclar concienzudamente el sistema. La mezcla de extracción resultante se procesa para formar fases distintas, una de las cuales contiene un enriquecimiento de la proteína. Dicho procesamiento puede realizarse, por ejemplo, por centrifugación de la mezcla de extracción o dejando que la mezcla se sedimente sin alteración alguna durante varias horas (sedimentación o coalescencia a 1 x la gravedad), o, por ejemplo, por separación de fases inducida por temperatura (Persson *et al.*, 1998, J. of Chromatography 711: 97-109). En un aspecto adicional, una vez que se han formado las fases diferenciadas, puede retirarse la fase que contiene un enriquecimiento de la proteína, es decir, típicamente la fase ligera superior.

En otra realización de la presente invención, después de la separación de la fase que contiene la proteína, la fase que no contiene la proteína en forma enriquecida se extrae de nuevo ("extracción en dos etapas"). La reextracción puede realizarse por adición de una solución que contiene un agente formador de fases capaz de formar una segunda fase ligera a fin de que la misma forme una fase en la reextracción que está enriquecida en la proteína. En otro aspecto, durante la extracción en dos etapas, la mezcla de extracción se agita para disolver los agentes formadores de fases y mezclar concienzudamente el sistema. La mezcla de re-extracción resultante se procesa para formar fases distintas, una de las cuales contiene la proteína enriquecida. Dicho procesamiento puede realizarse, por ejemplo, por centrifugación de la mezcla de reextracción o, por ejemplo, por separación de fases inducida por temperatura (Persson *et al.*, *supra*), o dejando que las fases se fusionen bajo 1 x gravedad.

En una realización preferida, los reactivos formadores de fases se añaden directamente a la mezcla bruta que contiene la proteína. Dichos reactivos formadores de fases son capaces de formar un sistema multifásico caracterizado por un resultado tal que la proteína se enriquece en una fase del sistema multifásico mientras que la mayor parte de los componentes restantes de la mezcla bruta no se acumulan en dicha una fase. Más preferiblemente, el sistema multifásico se caracteriza por el resultado de que la proteína se enriquece en una fase del sistema multifásico mientras sustancialmente la totalidad de los componentes restantes de la mezcla bruta se encuentran en la o las otras fases.

5.2.1 Agentes Formadores de Fases Útiles Para Purificación por Extracción Acuosa en Dos Fases

Pueden utilizarse una diversidad de reactivos capaces de formar un sistema multifásico y preferiblemente un sistema bifásico. En la presente invención, se utilizan PEG4600 y sulfato de amonio como agentes formadores de fase para crear dos fases.

Para la práctica de la presente invención, la concentración de los agentes formadores de fase puede ser variable. La concentración de los agentes se proporciona en todos los casos en peso del agente referido a volumen de la solución multifásica (o bifásica) total, a no ser que se indique otra cosa. En un aspecto, la concentración del polímero formador de fases es de aproximadamente 4% a aproximadamente 18%, de modo más preferible desde aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, de modo más preferiblemente desde aproximadamente 8% a aproximadamente 13%, y de modo muy preferible desde aproximadamente 6% a aproximadamente 12%. En otro aspecto, la concentración de la sal formadora de fases es de aproximadamente 4% a aproximadamente 18%, de modo más preferible desde aproximadamente 6% a aproximadamente 15%, de modo más preferible desde aproximadamente 8% a aproximadamente 13%, y de modo muy preferible desde aproximadamente 10% a aproximadamente 12%.

En otra realización adicional de la presente invención, se añade un tampón a la mezcla de extracción que contiene, por ejemplo, un lisado de células y los agentes formadores de fases, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón de fosfato, un tampón MES, un tampón HEPES o un tampón de citrato. En una realización preferida, se utiliza un tampón Tris. El pH de la solución tampón es por regla general desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de modo más preferible desde aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de modo más preferible desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 y de modo muy preferible, aproximadamente 7.

En otra realización, puede añadirse una sal a la mezcla de extracción, por ejemplo, una sal de un catión monovalente, v.g., sodio, potasio, litio o cesio, o un catión bivalente, v.g., magnesio, calcio. El anión de la sal puede ser monovalente, v.g., cloruro, nitrato, yoduro, tiocianato. En un aspecto preferido, la sal es cloruro de sodio. La concentración de la sal en la mezcla de extracción es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1000 mM, con preferencia desde aproximadamente 20 mM a aproximadamente 700 mM, y con preferencia desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM, con preferencia aproximadamente 70 mM a aproximadamente 200 mM, y de modo muy preferible aproximadamente 100 mM. La sal puede añadirse a la mezcla de extracción en cualquier momento a lo largo del procedimiento, v.g., antes de añadir los agentes formadores de fases, después de añadir uno o más de los agentes formadores de fases, o como parte de la solución tampón. Para antecedentes acerca del uso de un aditivo salino en purificación por extracción en dos fases, véase, v.g., Boris Y. Zaslavsky, *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications* (Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1995).

La centrifugación para la formación de las fases se realiza por lo general a temperaturas de aproximadamente 10 grados Celsius ("°C") a aproximadamente 40°C, de modo más preferible a una temperatura comprendida entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C, de modo más preferible a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C, y de modo muy preferible a aproximadamente 25°C.

Los métodos de extracción de la presente invención se llevan a cabo generalmente con un volumen de mezcla de extracción inicial inferior a aproximadamente 10 litros. En otra realización, el volumen de la mezcla de extracción es mayor que aproximadamente 10 litros y menor que aproximadamente 100 litros. En otra realización adicional, el volumen de la mezcla de extracción es mayor que aproximadamente 100 litros.

Los rendimientos obtenidos, después de la extracción en dos fases, cuando se purifica una proteína o polipéptido utilizando el método de la presente invención, pueden expresarse en gramos por mil litros de cultivo de células. Por ejemplo, cuando se purifica una proteína a partir de un cultivo de *E. coli* utilizando los métodos de la invención, el rendimiento por mil litros de cultivo de células es al menos aproximadamente 100 g, con preferencia al menos aproximadamente 200 g, de modo más preferible al menos aproximadamente 300 g, de modo más preferible al menos

aproximadamente 400 g, de modo muy preferible al menos aproximadamente 500 g, de modo preferible al menos aproximadamente 600 g, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 700 g.

5.3. Detección y Pureza de la Proteína Después de Purificación por Extracción Acuosa en Dos Fases

Después de la purificación por extracción, la proteína puede detectarse en la fase separada del sistema de extracción. Por ejemplo, la proteína puede detectarse por una diversidad de métodos que incluyen, pero sin carácter limitante, bioensayos, HPLC, determinación de aminoácidos o ensayos inmunológicos, v.g., radioinmunoensayo, ELISA, transferencia Western utilizando fijación de anticuerpos, y SDS-PAGE. Tales anticuerpos incluyen, pero sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, y fragmentos de fijación de epítopes de cualquiera de los anteriores.

La cantidad de la proteína purificada y su nivel de pureza pueden determinarse por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, y sin carácter de limitación alguno, puede examinarse una formulación de proteínas que se había preparado utilizando el método de la presente invención con electroforesis en gel de poliácridamida, seguido por tinción del gel para visualizar la proteína total en el gel. En una realización preferida, el rendimiento y la pureza de la proteína después de la extracción en dos fases se determinan utilizando HPLC en fase inversa.

La pureza de una formulación de una proteína o polipéptido preparada utilizando el método de la presente invención puede variar dependiendo del material de partida. Por ejemplo, cuando se purifica una proteína que se expresa en *E. coli*, la preparación resultante contiene al menos aproximadamente 40% en peso de la proteína o polipéptido de interés, de modo más preferible al menos aproximadamente 50%, de modo más preferible al menos aproximadamente 60%, de modo más preferible al menos aproximadamente 70% y de modo muy preferible al menos aproximadamente 80%.

5.4. Procesamiento de la Proteína Después de Purificación por Extracción Acuosa en Dos Fases

La preparación de proteínas o polipéptidos obtenida utilizando el método de la presente invención puede procesarse ulteriormente, por ejemplo, con objeto de proporcionar la proteína o polipéptido a un nivel de pureza mayor. Dicha pureza mayor puede requerirse dependiendo del uso para el cual se destine la proteína o el polipéptido. Por ejemplo, los usos terapéuticos de la proteína requerirán típicamente purificación ulterior después de los métodos de extracción de la invención.

Todos los métodos de purificación de proteínas conocidos por los técnicos expertos pueden utilizarse para purificación ulterior. Dichas técnicas han sido descritas extensamente en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Methods in Enzymology, Volumen 152, Academy Press, San Diego, CA (1987); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, todos los Vols., 1989, y actualizaciones periódicas de los mismos; New Protein Techniques: Methods in Molecular Biology, Walker, J.M., compil., Humana Press, Clifton, N.J., 1988; y Protein Purification: Principles and Practice, 3ª Ed., Scopes, R.K., Springer-Verlag, New York, N.Y., 1987. En general, pueden utilizarse técnicas que incluyen, pero sin carácter limitante, precipitación con sulfato de amonio, centrifugación, intercambio iónico; filtración con gel, cromatografía en fase inversa (y las formas HPLC o FPLC de la misma), y cromatografía de interacción hidrofóbica, para purificar ulteriormente la proteína.

Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención, pero no se proporcionan en modo alguno para limitar el alcance de la presente invención.

6. Ejemplo

6.1. Purificación del antagonista de la hormona de crecimiento recombinante por extracción acuosa en dos fases

6.1.1. Materiales y Métodos

Los agentes formadores de fase incluían polietilen-glicol ("PEG"), una sal y un tampón. La concentración de agentes se proporciona en todos los casos en peso del agente referido a peso de la solución multifásica (o bifásica) total, a no ser que se indique otra cosa. El PEG se obtuvo de Aldrich (PEG 2000 y PEG 8000) o de Union Carbide (PEG 4600, grado Senti). El tampón Tris y el sulfato de amonio se obtuvieron de J.T. Baker (Phillipsburg, N.J.). La HPLC se realizó en un sistema cromatográfico Hewlett Packard 1090. La homogeneización de los cultivos celulares se llevó a cabo con un microfluidizador Microfluidics M110Y o M-210EH, o un homogeneizador Alfa-Laval Niro.

6.1.1.1. Procedimiento General de Extracción

A no ser que se indique otra cosa los ejemplos que siguen, se lisaron células de *Escherichia coli* utilizando homogeneización a alta presión de las células directamente a partir del caldo de cultivo (que contenía EDTA) o después de centrifugación. Después de la centrifugación, las células se congelaron y se guardaron a -20°C o -70°C. El sedimento de células congelado se suspendió de nuevo y se homogeneizó. El lisado de células se puso en un depósito agitado y se añadieron agentes formadores de fases para producir el sistema final deseado (Figura 1).

Como ejemplo de procedimiento anterior, pudo obtenerse un sistema con 10% de sulfato de amonio y 10% de PEG 4600 añadiendo a 7 litros de lisado, en cualquier orden, 1 litro de tampón Tris 1 M, pH 7,4, 1 kg de sulfato de amonio y 1 kg de PEG. La mezcla se agitó hasta que todos los agentes se hubieron disueltos, seguido por centrifugación para separar las fases. GHA y el perfil de contaminantes de las fases resultantes se determina por análisis SDS-PAGE y HPLC de fase inversa. La fase pesada, rica en sal, puede reextraerse por adición de una solución de PEG y por repetición de los pasos de agitación y de centrifugación. La solución de PEG añadida para reextracción puede tener una concentración de 30% a 40% PEG, véase Figura 1.

Se encontró que diversos parámetros influyen en la operatividad y el rendimiento del procedimiento de extracción. Entre estos parámetros se encuentran el tipo y la concentración de PEG, el tipo y la concentración de sal, el pH del sistema, la presencia de componentes del medio de cultivo, y residuos bacterianos.

El rendimiento del procedimiento puede maximizarse por ajuste de varios de los parámetros mencionados anteriormente. En primer lugar, la relación volumétrica de fases, *es decir*, el volumen de las fases una con relación a otra, puede modificarse sin cambiar el coeficiente de reparto de la proteína. Como se muestra en la Figura 2, las concentraciones de PEG y de sal pueden ajustarse a lo largo de la línea de enlace sin cambiar el coeficiente de reparto de la proteína en la fase rica en sal o la fase rica en PEG. Así pues, llevando el sistema cercano al punto a, véase la Figura 2, puede aumentarse el rendimiento de la proteína. En segundo lugar, es posible ajustar las concentraciones de PEG y sal para desplazarse a otra línea de enlace en la cual la proteína tenga un coeficiente de reparto diferente para las fases. En tercer lugar, después de la extracción inicial y después de la separación de la fase rica en PEG, es posible reextraer la fase que es rica en residuos celulares por adición de una solución de PEG en agua o tampón a una concentración de 30-40% seguida por agitación, centrifugación y separación de la fase rica de PEG como se hizo en la primera extracción.

Se encontró que la separación de fases en un sistema bifásico que comprende PEG y sulfato de amonio era sensible a la temperatura durante el paso de centrifugación en el cual se esperaba que se formaran las fases. Si bien las fases se formaron rara vez por centrifugación alrededor de 4°C, la separación de las fases se producía fácilmente a temperaturas comprendidas en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C.

Cuando se aisló rGHA utilizando los procedimientos de extracción descritos, se encontró que rGHA precipitaba cuando se mantenía en la fase rica en PEG. Este problema se evitó por dilución de la fase con agua después de su separación del resto del sistema de extracción. Se encontró que factores de dilución de hasta 5 veces eran útiles y eficaces para prevenir la precipitación de rGHA.

Cuando se aislaba rGHA era importante evitar la formación de espuma, dado que ambas proteínas parecían sensibles a las interfases líquido-aire.

6.2. Extracción de rGHA Utilizando Condiciones Diferentes

Se aisló la GHA humana recombinante purificada utilizando el método de extracción bifásico con agentes diferentes a valores de pH diferentes. Los agentes formadores de fase utilizados fueron PEG, sulfato de amonio y tampón Tris. Se utilizó PEG en 3 pesos moleculares diferentes, a saber, 2000, 4600 y 8000 Daltons. Para cada una de estas versiones de peso molecular, la concentración de PEG en la mezcla de extracción era 15%. Se utilizó sulfato de amonio a una concentración de 15% en la mezcla de extracción. Se preparó tampón Tris como una solución 1M y se utilizó a una concentración de 100 mM en la mezcla de extracción. El valor de pH para el tampón Tris utilizado era 6,0 u 8,0.

Después de añadir los agentes formadores de fases a la solución purificada de GHA, la mezcla resultante se agitó y se centrifugó luego en una microcentrífuga a una velocidad de 14000 rpm durante 5 minutos a la temperatura ambiente. Después del paso de centrifugación, se retiró la fase superior rica en PEG y se analizaron las fases por HPLC en fase inversa. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

ES 2 303 507 T3

TABLA 1

Reparto de GHA recombinante en sistemas bifásicos con 15% de PEG y 15% de sulfato de amonio

PEG	pH	Vol. de la fase superior (ml)	Vol. de la fase inferior (ml)	Conc. de rGHA superior (mg/ml)	Conc. rGHA fondo (mg/ml)
2000	8,0	0,35	0,5	0,643	LOD1
2000	6,0	0,35	0,5	0,634	LOD1
4600	8,0	0,25	0,6	0,675	LOD1
4600	6,0	0,25	0,6	0,673	LOD1
8000	8,0	0,25	0,6	0,570	LOD1
8000	6,0	0,30	0,5	0,557	LOD1
*LOD: límite de detección, es decir, que no se detectó rGHA alguno utilizando los medios descritos.					

Los resultados presentados en la Tabla 1 demuestran que la extracción tenía una eficiencia aproximadamente igual a pH 6 y 8. Entre las diversas formas de PEG examinadas, los mejores rendimientos se obtuvieron con PEG de peso molecular 4600 Dalton de acuerdo con la invención.

6.3. Características de Reparto de hGH (ejemplo de referencia)

Se determinó el coeficiente de reparto de hGH en un sistema bifásico utilizando PEG y sulfato de amonio. La composición de la mezcla era 10% PEG 4600, 10% sulfato de amonio y tampón Tris 100 mM de pH 7,2. En algunos ensayos, el sistema incluía también NaCl 100 mM. Se disolvió hGH liofilizada en agua a una concentración de 5 mg/ml.

Se llevó a cabo un experimento de extracción mezclando en un tubo Eppendorf 20 μ l de la solución stock de hGH, 380 μ l de agua, 100 μ l de tampón Tris 1M a pH 7,2, 250 μ l de una solución de PEG 4600 al 40% y 250 μ l de una solución de sulfato de amonio al 40%. Después de una mezcladura concienzuda, se centrifugó la solución en una microcentrífuga a 14000 rpm o 13000 x g. La concentración de hGH en las fases superior e inferior se determinó luego por HPLC en fase inversa.

TABLA 2

Reparto de GH humana en un sistema bifásico con 10% PEG y 10% sulfato de amonio

Tampón utilizado*:	Ejecución #:	Fase superior: hGH (mg/ml)	Fase superior: volumen (μ l)	Fase inferior: hGH (mg/l)	Fase inferior: volumen (μ l)	Coeficiente de reparto
Tris. HCl	1	233,1	350	13,11	600	10,37
Tris. HCl	2	235,8	400	8,06	600	19,5
Tris	1	231,1	400	8,57	600	17,9
Tris	2	243,7	400	6,59	600	24,6
Tris. NaCl	1	243,9	400	5,81	600	28,0
Tris. NaCl	2	258,6	400	5,61	600	30,7
*: Tris. HCl: TRIS-HCl 1M, pH 7,2 Tris: TRIS-base 1M, pH 7,2 Tris, NaCl: TRIS-base 1M, NaCl 100 mM, pH 7,2						

Los resultados presentados en la Tabla 2 demuestran que hGH se repartía preferiblemente en la fase rica en PEG del sistema de extracción.

ES 2 303 507 T3

6.4. Extracción de rGHA a Partir de Pasta de Células Muertas por Calentamiento y Congeladas

Una pasta de células de *E. coli* muertas por calentamiento y congeladas se suspendió en 10 volúmenes de tampón Tris 0,02M a pH 7,65 que contenían EDTA 5 mM, v.g., se utilizaron 10 ml de tampón para suspender 1 g de pasta de células congelada. Las células se lisaron por homogeneización en un solo paso a 13.000 hasta 15.000 psi (913,9 a 1.054,5 kg/cm²) conduciendo a la rotura de más del 95% de las células tal como se determinó por inspección del lisado con un microscopio. Se añadieron PEG de peso molecular 4600 y sulfato de amonio a una concentración final de 15% de cada uno, seguido por mezcla concienzuda y, finalmente, centrifugación a 5000 rpm, o 7280 x g durante 30 minutos a 25°C. Aunque el procedimiento anterior se comportaba mejor que si se utilizara PEG de pesos moleculares 2000 u 8000, se encontró que los residuos celulares no se sedimentaban eficazmente y que las fases se separaban deficientemente.

Para mejorar la purificación de la proteína, se empleó en el protocolo anterior una concentración más baja de PEG o sulfato de amonio, o ambos. Las concentraciones que eran más útiles para extracción de rGHA fueron 6-10% de PEG y 10-12% de sulfato de amonio.

Después de la centrifugación en el procedimiento de extracción anterior, aparecieron dos fases líquidas y dos fases sólidas, de las cuales la fase clara superior contenía un enriquecimiento en rGHA. El análisis SDS-PAGE demostró que una cantidad importante de rGHA se sedimentaba con los residuos celulares en la fase inferior.

6.5. Extracción de rGHA a partir de Células Vivas Congeladas

Se prepararon células de *E. coli* vivas congeladas por centrifugación de las células cultivadas a 5000 rpm, 7280 x g durante 30 minutos a 4°C y transferencia del sedimento de células a una bolsa susceptible de sellado para congelación a -70°C. El procedimiento de extracción se llevó a cabo como se describe en la sección 6.4., *supra*. Los resultados se resumen en las Tablas 3 y 4. Todos los datos presentados en las Tablas 3 y 4 se obtuvieron con una sola extracción, es decir sin una segunda o ulterior extracción de la fase rica en residuos celulares pesados.

TABLA 3

Recuperación de GHA recombinante a partir de células vivas congeladas utilizando extracción en dos fases

Escala (peso total del sistema)	PEG 4600 (%)	Sulfato de amonio (%)	Fase ligera de rGHA (µg/ml)	Fase ligera de rGHA total (mg)	Fase pesada de rGHA (µg/ml)	Fase pesada de rGHA total (mg)
30 g	6	12	2291	11,4–13,7	227	4,5–5,7
30 g	10	10	1608	16,1	196	3,5
30 g	8	10	1697	15,2	275	5,5
15 g	10	10	1736	7,81	171	1,54
15 g	8	10	1726	6,9	254	2,41

TABLA 4

Coefficiente de reparto de GHA recombinante en la extracción de dos fases a partir de células vivas congeladas

Escala (peso total del sistema)	PEG 4600 (%)	Sulfato de amonio (%)	rGHA soluble, % en la fase ligera	rGHA soluble, % en la fase pesada	Coefficiente de reparto
30 g	6	12	67–75,3	24,7–33	10,1
30 g	10	10	82	18	8,2
30 g	8	10	73	27	6,1
15 g	10	10	83	17	10,1
15 g	8	10	74	26	6,8

ES 2 303 507 T3

El rendimiento del procedimiento anterior se incrementó por una segunda extracción de la fase pesada que es rica en residuos celulares. Se llevó a cabo una extracción en dos etapas por ejecución de una primera extracción con 8% de PEG 4600 y 10% sulfato de amonio. La escala en la que se realizaron los experimentos, es decir, el peso total del sistema, era 30 g para la primera extracción y 15 g para la segunda extracción. La reextracción se llevó a cabo por adición de una solución de PEG al 40% en agua a la fase pesada después que se había separado la fase ligera de la primera extracción. A continuación, la mezcla se agitó y se centrifugó a 5000 rpm, 7200 x g durante 30 minutos a 25°C. La Tabla 5 presenta los resultados del procedimiento de extracción en dos etapas arriba descrito. El procedimiento se realizó con homogeneizado bruto inmediatamente después de la homogeneización y con el sobrenadante del homogeneizado después de la centrifugación.

TABLA 5

Extracción en dos etapas de rGHA recombinante a partir de células vivas congeladas utilizando extracción en dos fases

Experimento	Fase superior 1: rGHA (µg/ml)	Fase superior 1: rGHA total (mg)	Fase superior 2: rGHA (µg/ml)	Fase superior 2: rGHA total (mg)	Fase inferior: rGHA (µg/ml)	Fase inferior: rGHA total (mg)
Lisado bruto	1717	15,4	680	7,14	155	2,79
Sobrenadante del lisado	1306,5	5,88	687	3,43	171	1,2
	% rGHA total		% rGHA total		% rGHA total	
Lisado bruto	61		28		11	
Sobrenadante del lisado	56		33		11	

Los rendimientos de rGHA recombinante utilizando el procedimiento de extracción bifásico en dos etapas fueron hasta aproximadamente 4,6 mg de rGHA por gramo de pasta de células vivas congeladas. Las preparaciones de rGHA recombinante obtenidas con el procedimiento de extracción bifásico en dos etapas se examinaron respecto a pureza por análisis HPLC en fase inversa de la fase ligera rica en rGHA y la fase pesada rica en residuos celulares. Los resultados típicos de tales extracciones se presentan en las Figuras 3A-3C.

6.6. Extracción de rGHA a Partir de Células Vivas

Células de *E. coli* cultivadas se cosecharon, agruparon y lisaron por microfluidización en un solo paso a 14.000 psi (984,2 kg/cm²). El lisado de células resultante se utilizó en el procedimiento de extracción añadiendo a 21 litros de lisado 3 litros de tampón Tris 1M a pH 7,2, 3 kg de sulfato de amonio y 3 kg de PEG 4600. La mezcla resultante se mezcló concienzudamente y se centrifugó luego a 5000 rpm durante 30 minutos a 25°C. La fase superior se recuperó y la fase inferior se reextrajo con 6 litros de una solución al 40% de PEG 4600 en agua. Después de mezcladura y centrifugación como para la primera extracción, se separó la segunda fase superior y se agrupó con la primera fase superior. El rendimiento en proteína rGHA era 22,3 g o 1,06 g de rGHA por litro de cultivo de células inicial.

6.7. Purificación por Extracción Utilizando Centrifugación Continua en Escala Intermedia

Se utilizó una centrífuga continua de discos apilados Alfa Laval LAPX 202 para aplicar extracción en dos fases en una escala intermedia. La centrífuga se modificó como un purificador con una sola alimentación, dos efluentes líquidos y expulsión axial de los sólidos. La centrífuga se alimentó con una bomba peristáltica de velocidad variable. La tasa de alimentación óptima era alrededor de 450 ml/minuto cuando se utilizó un anillo de gravedad de 52 mm. Se determinó que era suficiente un intervalo de descarga de 15 a 20 minutos. Después de centrifugación a 10000 rpm u 8200 x g, la fase superior recuperada con la LAPX 202 contenía menos de 5% de contaminantes de la fase inferior. Se llevó a cabo una extracción en dos etapas por reextracción de la fase inferior con un volumen mitad del de la fase inferior utilizando una solución al 33% de PEG 4600.

El rendimiento a partir de 20 litros de cultivo fue 25,2 g de rGHA o 1,26 g/l de cultivo. Se recuperaron 21,7 g u 86,3% de la proteína durante la primera extracción, y los 3,4 g restantes o 3,7% se obtuvieron durante la segunda extracción.

ES 2 303 507 T3

6.8. Purificación por Extracción Utilizando Centrifugación Continua en Gran Escala

Se utilizó una centrífuga de discos apilados Alfa Laval BTX 205 equipada con un kit purificador de conversión para realizar una extracción en dos fases en gran escala, *es decir*, un aumento de escala de aproximadamente 10 veces comparado con el procedimiento de escala intermedia. Se determinó que la tasa de alimentación apropiada era aproximadamente 3-5 l/minuto. Se llevó a cabo la extracción en gran escala por homogeneización del caldo de fermentación o células suspendidas utilizando el homogeneizador Niro a 13.000 hasta 15.000 psi (903,9 a 1.054,5 kg/cm²), seguido por adición a 700 litros de lisado, en el orden indicado, de 100 litros de tampón Tris 1M a pH 7,2, 100 kg de sulfato de amonio y 100 kg de PEG 4600. La solución se mezcló concienzudamente y se centrifugó a 9600 rpm o 12700 x g. La proteína se recuperó a partir de la fase rica en PEG.

El rendimiento en una extracción de una sola etapa, es decir, sin realizar una reextracción, era aproximadamente 700 g a aproximadamente 1000 g de rGHA por 1500 l de caldo de fermentación.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificación de proteínas recombinantes antagonistas de la hormona del crecimiento ("rHGA"),
que comprende

(a) añadir un primer y un segundo agente formador de fase a una muestra que contiene rGHA, en donde dichos agentes primero y segundo formadores de fase pueden añadirse en cualquier orden;

(b) mezclar la muestra del paso (a);

(c) separar la muestra del paso (b) en dos fases;

en donde no se añade a la muestra agente caotrópico alguno;

en donde el primer agente formador de fase es sulfato de amonio;

en donde el segundo agente formador de fase es PEG 4600.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el paso (c) se condice a una temperatura de 20°C a 30°C.

3. El método de una de las reivindicaciones 1 a 2, en donde se utiliza desde aproximadamente 4% a aproximadamente 18% de dicho sulfato de amonio y en donde se utiliza desde aproximadamente 4% a aproximadamente 18% de dicho PEG.

4. El método de la reivindicación 3, en donde se utiliza desde aproximadamente 10 a 12% de dicho sulfato de amonio y en donde se utiliza desde 6 a 10% de PEG 4600.

5. El método de la reivindicación 3 ó 4, en el que se utiliza un tampón.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente los pasos:

(d) extracción de rGHA de la fase ligera rica en PEG;

(e) retirada de la fase ligera rica en PEG;

(f) adición de una solución de PEG a una concentración de 30% a 40%;

(g) mezcladura de la muestra del paso (f);

(h) separación de la muestra del paso (g) en dos fases; e

(i) extracción de rGHA a partir de la fase ligera rica en PEG del paso (h).

7. El método de la reivindicación 6, en el cual la solución de PEG del paso (f) comprende adicionalmente un tampón.

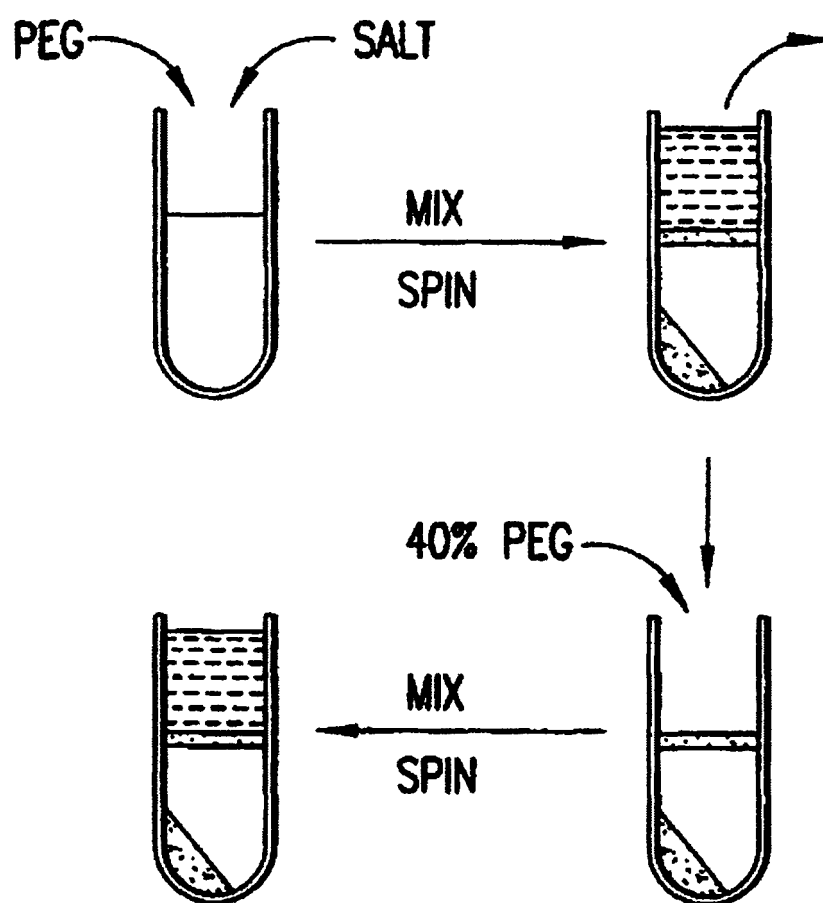


FIG.1

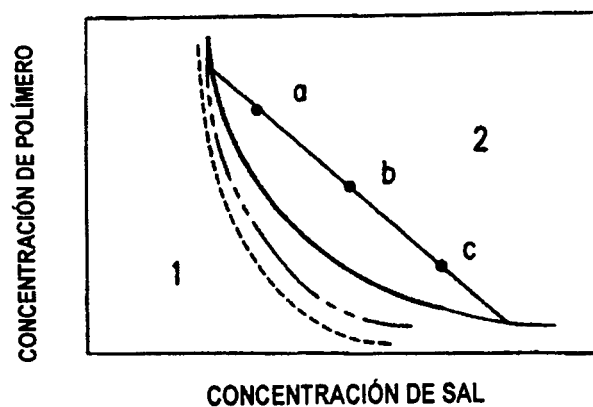
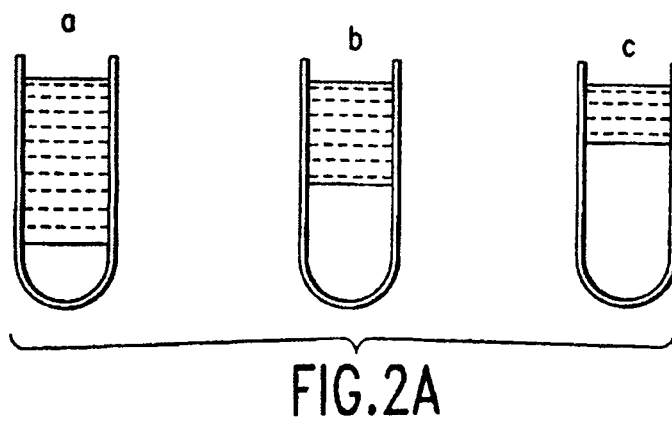
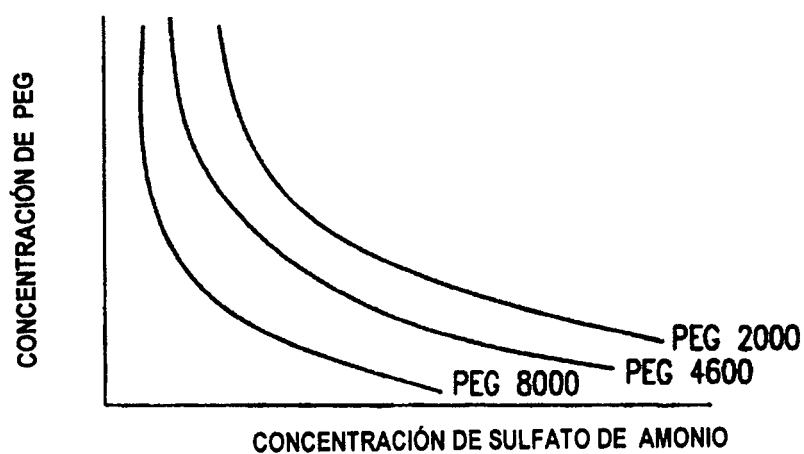


FIG.2B



SOBRENADANTE DEL CALDO DE FERMENTACIÓN HOMOGENEIZADO

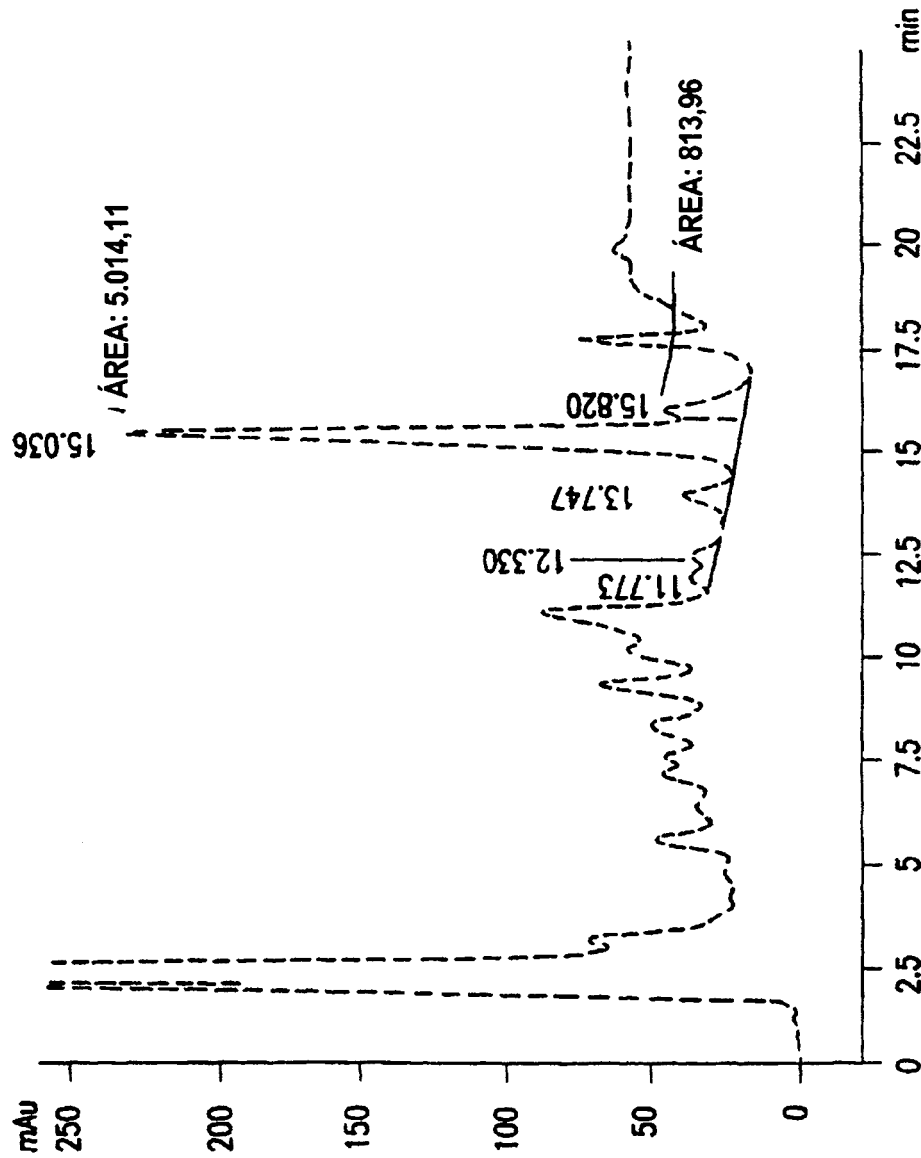
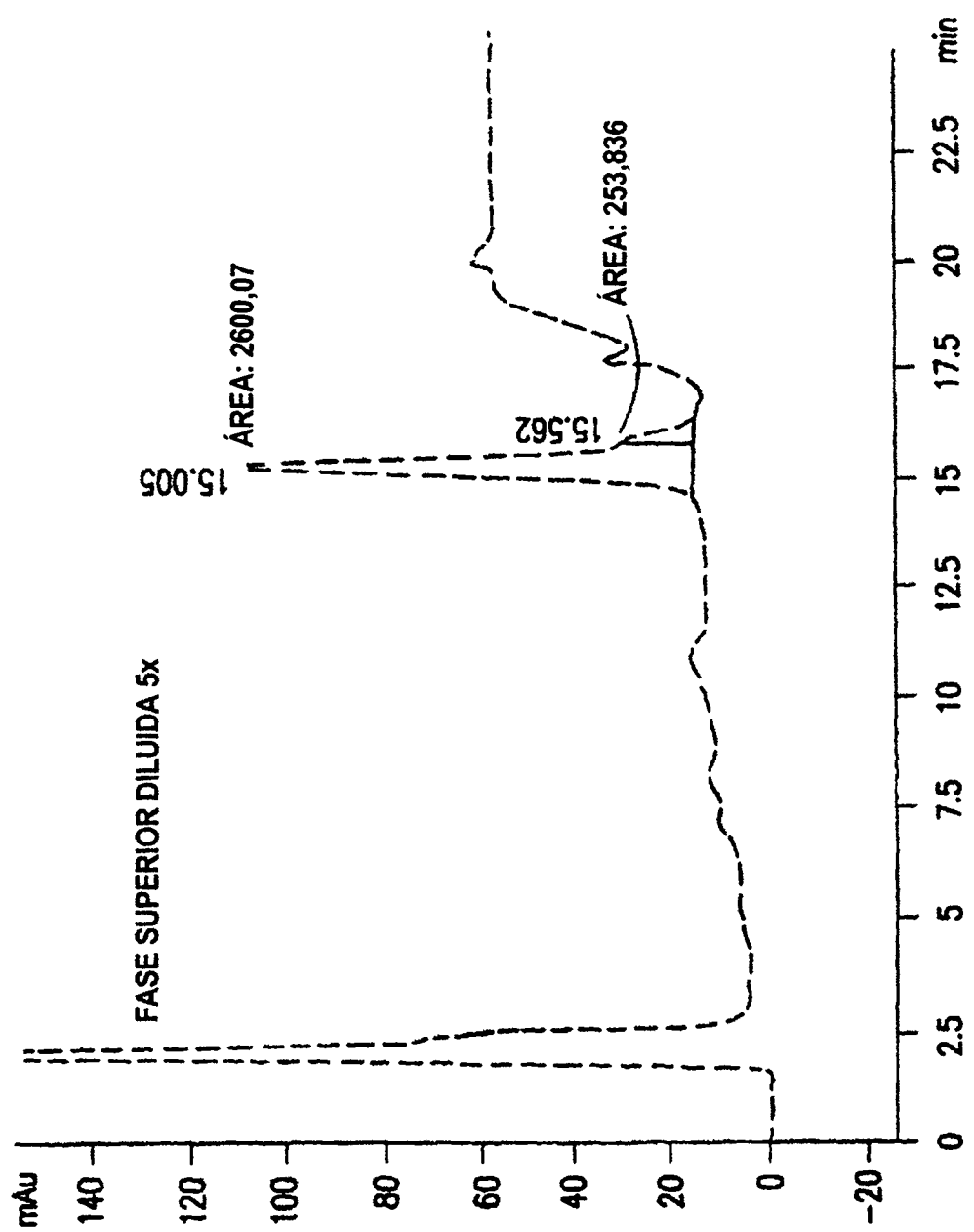


FIG.3A



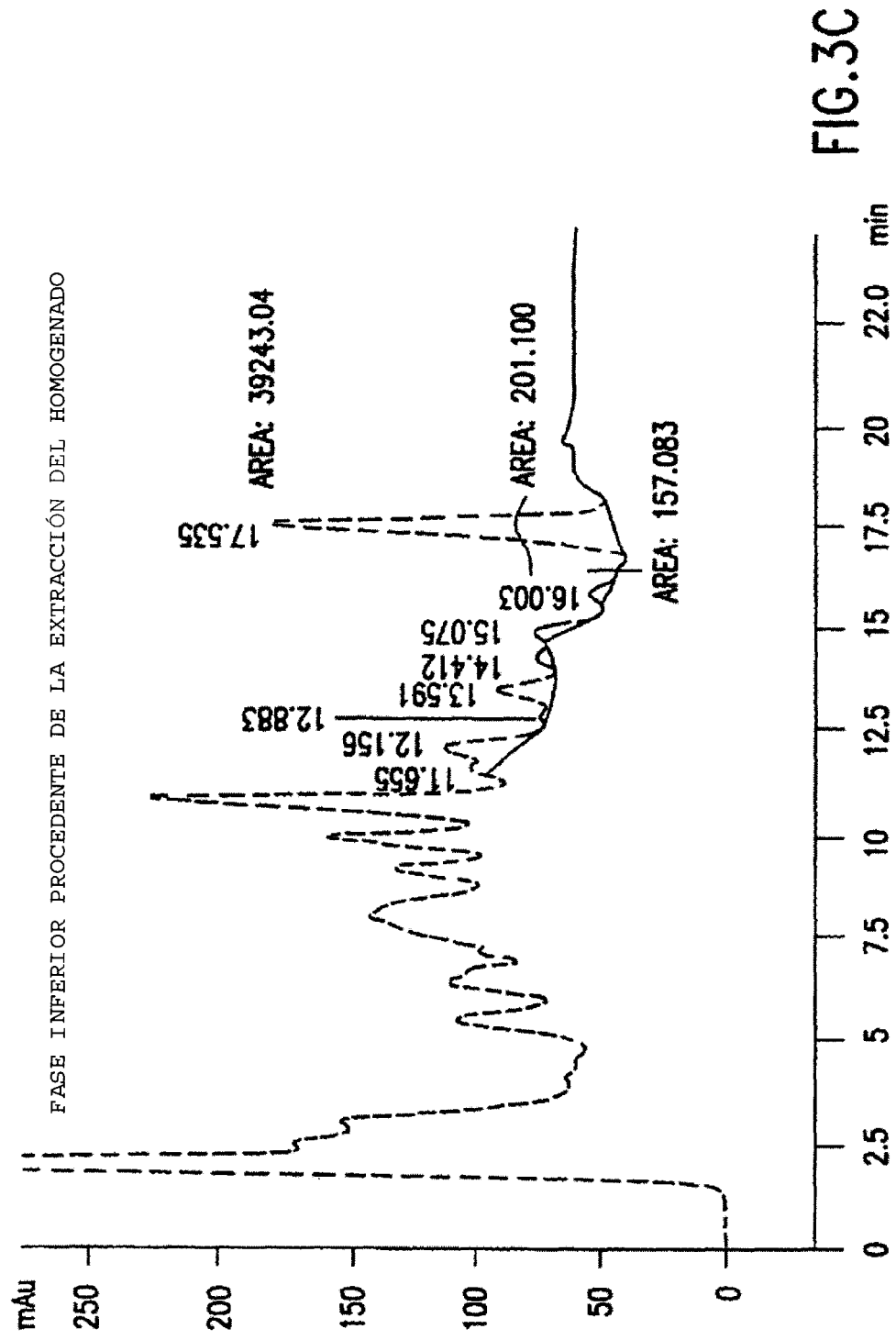


FIG.3C