



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 796**

51 Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01967348 .2**

86 Fecha de presentación : **30.08.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1315757**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2003**

54 Título: **Procedimiento de purificación de proteínas EPI-HNE.**

30 Prioridad: **04.09.2000 EP 00203049**
31.10.2000 EP 00403029
10.07.2001 EP 01202655

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **DEBIOPHARM S.A.**
Forum "Apres-Demain" chemin Messidor 5-7
Case Postale 5911
1002 Lausanne, CH

72 Inventor/es: **Poncin, Alain;**
Saudubray, Francois y
Bokman, Anne

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de proteínas EPI-HNE.

La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para la purificación de las proteínas EPI-HNE.

La Solicitud de Patente Internacional WO 96/20278 de Ley y col. describe un número de proteínas novedosas manipuladas genéticamente que inhiben la elastasa de los neutrófilos humanos (hNE). Como se indica en la Solicitud de Patente citada anteriormente, la elastasa de los neutrófilos humanos (también conocida como elastasa de los leucocitos humanos) es una de las proteasas neutrales principales de los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares. Esta enzima está implicada en la eliminación de patógenos, y en reestructuración del tejido conectivo.

El inhibidor sistémico principal de hNE es el inhibidor de α -1-proteasa, conocido en otros tiempos como α 1-anti-tripsina. En un cierto número de situaciones patológicas (trastornos hereditarios, enfisema, fibrosis quística, síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto ARDS, enfermedad pulmonar obstructiva crónica COPD), este inhibidor bien no está presente en cantidades suficientes en la corriente sanguínea o bien está inactivado, conduciendo a actividad elastolítica incontrolada de hNE, que causa destrucción extensiva del tejido pulmonar.

El documento WO 96/20278 propone así proteínas novedosas que son inhibidores altamente eficaces estables, no tóxicos de hNE. Estos inhibidores forman parte de un grupo de inhibidores derivados de un dominio inhibidor de tipo Kunitz hallado en inhibidor de tripsina pancreática básico (BTPI) o una proteína de origen humano, concretamente la cadena ligera del inhibidor de inter- α -tripsina humana (ITI). Hay, entre otros, EPI-HNE-1, EPI-HNE-2, EPI-HNE-3 y EPI-HNE-4. Los inhibidores del documento WO 96/20278 se producen mediante procedimientos biotecnológicos y contienen secuencias modificadas de DNA, con respecto a los dominios de Kunitz biológicos, que se vuelven altamente potentes. Uno de estos inhibidores, EPI-HNE-4, es de interés particular.

El documento WO 96/20278 describe preparación de sistemas de producción de *Pichia pastoris* para inhibidores de hNE EPI-HNE-1, EPI-HNE-2, EPI-HNE-3 y EPI-HNE-4, producción y purificación de proteínas (véanse en particular ejemplos 10-15).

La cepa GS115 mutante de la levadura *Pichia pastoris* que contiene un gen de deshidrogenasa de histidinol no funcional (his4) se transformó mediante plásmidos de expresión que comprenden una secuencia que codifica el pre-propéptido de factor alfa de apareamiento de *S. cerevisiae* condensado directamente al extremo aminoterminal del inhibidor de hNE deseado, bajo el control del promotor génico de *aox1* de *P. pastoris* inducible anterior en la cadena y de las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación de *aox1* posteriores en la cadena. Los plásmidos de expresión se linearizaron mediante digestión con SacI y el DNA lineal se incorporó mediante recombinación homóloga dentro del genoma de la cepa GS115 de *P. pastoris* mediante transformación esferoplástica, selección para el crecimiento en ausencia de histidina añadida y rastreo de fenotipo de utilización de metanol, niveles de secreción y dosis génica (estimada mediante prueba de bandas de Southern). Se seleccionaron así las cepas que se estimó que tenían aproximadamente cuatro copias del plásmido de expresión integradas según una disposición en tándem dentro del locus génico de *aox1*.

Los cultivos de las cepas seleccionadas se cultivaron en modo de tandas con glicerol como la fuente de carbono, después tras el agotamiento del glicerol se cultivaron en modo de alimentación limitada en glicerol para incrementar adicionalmente la masa celular y desreprimir el promotor *aox1* y finalmente en modo de alimentación limitada en metanol. Durante la última fase el promotor *aox1* estuvo plenamente activo y la proteína se segregó dentro del medio de cultivo.

Ley y col. indicaron después que las proteínas se purificaron usando técnicas bioquímicas estándar, variando el procedimiento de purificación específico con las propiedades específicas de cada proteína. Brevemente, el medio de cultivo se centrifugó, el sobrenadante se sometió a microfiltración y subsiguientemente a ultrafiltración, posiblemente a diafiltración, y después la proteína se recuperó mediante precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico.

Los procedimientos de producción y purificación específicos se describen en el documento WO 96/20278 sólo para EPI-HNE2 y EPI-HNE3, comenzando el rendimiento de la purificación general a partir de un medio de cultivo que contiene 720 mg/l y 85 mg/l siendo aproximadamente del 30% y el 15,0%, respectivamente, para una pureza para cada una de esas proteínas de por encima del 95% según se valora mediante análisis de PAGE de alta resolución teñido con plata. El EPI-HNE3 purificado se describe que está sustancialmente libre de una forma alternativamente procesada de esta proteína que tiene una extensión amino de 7 a 9 residuos de aminoácidos y que representa aproximadamente el 15-20% de la actividad inhibidora de hNE.

EPI-HNE1 y EPI-HNE4 se enseñan sólo según se están produciendo y purificando en una forma análoga a EPI-HNE2 y EPI-HNE3, sin descripción alguna del procedimiento de purificación específico, el rendimiento de purificación o la pureza de la proteína purificada.

Los procedimientos para la purificación de proteínas EPI-HNE descritas en el documento WO 96/20278 no son apropiados para obtener cantidades de proteínas purificadas de calidad farmacéutica aceptable o a una escala industrial.

Es más la sucesión de las etapas de centrifugación, microfiltración y ultrafiltración no se puede llevar a cabo en una manera económicamente viable en una gran escala y conduce a rendimientos insuficientes. Además, como se muestra por el solicitante en el ejemplo 1, la proteína purificada no está separada de contaminantes farmacéuticamente inaceptables tales como pigmentos fluorescentes verdes segregados por *P. pastoris*.

El problema al que se refiere la invención es por lo tanto desarrollar un procedimiento para la purificación de una proteína EPI-hNE a partir del medio de cultivo de una cepa huésped capaz de expresar esa proteína, que no tenga los inconvenientes anteriormente mencionados.

El problema anterior se resuelve mediante la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

El procedimiento de la invención permite purificar grandes cantidades de una proteína EPI-HNE a partir de un medio de cultivo de una cepa de huésped que expresa esa proteína, con un rendimiento general de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente al menos el 60%, hasta un grado aceptable para usos farmacéuticos.

La invención se refiere a un procedimiento para la purificación de proteínas EPI-HNE, a partir del medio de cultivo de una cepa de huésped para la expresión de dichas proteínas, que comprende las etapas de:

- (a) hacer pasar una parte derivada del medio de cultivo sobre un lecho expandido de adsorbente de intercambio catiónico, con el fin de recuperar un eluato,
- (b) llevar a cabo opcionalmente separación cromatográfica de proteínas, de acuerdo con su hidrofobicidad, en el eluato resultante,
- (c) hacer pasar el eluato resultante a través de una columna de intercambio catiónico,
- (d) opcionalmente filtrar el medio resultante tal como para obtener un filtrado estéril, y
- (e) causar precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada y recuperar los cristales de proteína.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para la purificación de proteínas EPI-HNE, a partir del medio de cultivo de una cepa huésped para la expresión de dichas proteínas, que comprende las etapas de:

- (a) hacer pasar una parte derivada de un medio de cultivo sobre un lecho expandido de adsorbente de intercambio catiónico o una micromembrana inerte mecánicamente y químicamente, con el fin de recuperar un eluato,
- (b) llevar a cabo opcionalmente separación cromatográfica de proteínas, de acuerdo con su hidrofobicidad, en el eluato resultante,
- (c) hacer pasar el eluato resultante a través de una columna de intercambio catiónico,
- (d) opcionalmente filtrar el medio resultante tal como para obtener un filtrado estéril, y
- (e) opcionalmente causar precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada y recuperar los cristales de proteína.

Las cepas de huésped usadas para la expresión de las proteínas EPI-HNE se pueden seleccionar entre cepas adecuadas de cualesquiera organismos procariotas y eucariotas transformados por un vector para la expresión de dichas proteínas. Preferiblemente, la cepa de huésped se selecciona del grupo constituido por bacterias tales como *Escherichia coli*, *Streptomyces* o *Lactococcus* y levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizasaccharamyces pombe*, *Yarrowia lipilitica*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyverromyces lactis*, *Pichia metanolica* y *Pichia pastoris*, que son capaces de expresar niveles altos de una proteína recombinante. Incluso más preferiblemente, la cepa huésped es *Pichia pastoris*.

La expresión "parte derivada del medio de cultivo" tiene un significado específico en el contexto de la presente invención, como se indica más adelante.

Cuando la cepa huésped es capaz de segregar la proteína fuera de la célula, la parte derivada del medio de cultivo en la etapa (a) es el caldo de cultivo.

Cuando la cepa huésped expresa la proteína dentro de la célula, por ejemplo en el periplasma, la parte derivada del medio de cultivo en la etapa (a) es el producto de lisis de la misma.

ES 2 296 796 T3

La etapa (a) es una etapa de adsorción de lecho expandido llevada a cabo en un adsorbente de intercambio catiónico, bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, M. Hansson y col., 1994, *Biotechnol.* 12, páginas 285-288) o una etapa de filtración en una micromembrana mecánicamente y químicamente inerte.

5 El adsorbente de intercambio catiónico se puede basar en agarosa entrecruzada o sefarosa entrecruzada, modificada por la inclusión de un material de núcleo inerte, tal como cuarzo cristalino, para proporcionar la alta densidad requerida para expansión de lecho estable, preferiblemente de 1,1 a 1,5 g/ml, o circonio que tiene una densidad más alta entre aproximadamente 3,5 mg/ml, que permite un caudal más alto, y por unión de los grupos funcionales catiónicos de superficie, notablemente grupos catiónicos fuertes tales como sulfonato. Las partículas pueden ser esféricas, con un
10 tamaño de partícula medio de 100-300 μm , preferiblemente de 180-220 μm . Un adsorbente de intercambio catiónico adecuado es Streamline SP o Streamline SPLX de Amersham-Pharmacia.

En una realización preferida de la invención, el paso a través de un lecho expandido se lleva a cabo como sigue:

15 Se equilibran 10 litros de matriz cromatográfica (Streamline SP de Amersham-Pharmacia) en acetato de amonio 50 mM a pH 3,5 y se fluidiza en el mismo tampón a 30 l a 300 cm/h. El sistema permite la carga directa del medio de cultivo recogido, permitiendo así los aspectos adicionales de la centrifugación, microfiltración y ultrafiltración de la técnica previa, y permitiendo incremento en rendimientos. Después de cargar, la columna se lavó en el acetato de amonio 10 mM a pH 3,5 para obtener una absorción a 280 nm por debajo de 0,05. Las perlas se empaquetan a 10 l y
20 EPI-HNE-4 se recuperó lavando la columna en acetato de amonio 1 M en tampón de pH 4,5.

Una micromembrana inerte mecánicamente y químicamente aquí quiere decir un medio de microfiltración que tiene una compatibilidad de pH amplia, preferiblemente al menos entre 3 y 14, permite un flujo alto de filtrado y es capaz de resistir presión de ráfaga alta, preferiblemente al menos 10 bares, en particular al menos 50 bares, y
25 retropulsión. Tales membranas comercialmente disponibles se fabrican generalmente de cerámica. Ejemplos de tales membranas son Membralox® (J.M. Separations), Carbosep®/Kerasep™ (Rhodia) y Cartucho de Escala de Proceso Grande Procell™ (A/G Technology Corporation).

La etapa (b) es una etapa de interacción hidrófoba o una etapa de cromatografía en fase reversa que permite
30 separar una mezcla de proteínas de acuerdo con su hidrofobicidad. Esa etapa puede ser útil cuando se lleva a cabo la fermentación en una gran escala (por encima de 1 metro cúbico) y posiblemente pueden estar presentes contaminantes adicionales.

La cromatografía de interacción hidrófoba o la cromatografía en fase reversa se conoce bien en la técnica y se describe notablemente en "Protein purification, Second edition: Principles, High resolution Methods and applications",
35 Ed. J.C. Janson y L. Rydén, páginas 239-282.

Es preferible una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba dado que se puede llevar a cabo sin usar disolventes orgánicos.
40

Una matriz adecuada es un polímero tal como poliestireno, metacrilato reticulado de poliestireno-divinilbenceno, metacrilato modificado, poliacrilamida, agarosa reticulada o sefarosa reticulada, que lleva un ligando que tiene una hidrofobicidad entre la hidrofobicidad conferida por un grupo alquilo de C2 y la hidrofobicidad conferida por un grupo alquilo de C8. Ejemplos de tales ligandos son etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terciobutilo, pentilo, isopentilo, hexilo, fenilo, isopropanol, isobutanol, éter C₄-C₆. Se prefiere fenilo.
45

Ejemplos de matrices adecuadas son hexilo de Toyopearl 650C (metacrilato modificado con ligando de hexilo), éter de Toyopearl 650M (metacrilato modificado con ligando de butilo) y fenilo de Toyopearl 650M (metacrilato modificado con ligando de fenilo), disponibles de Tosohaas; Recurso ETH (poliestireno-divinilbenceno con ligando de etilo), Recurso ISO (poliestireno-divinilbenceno con ligando de isopropanol), Recurso Phe (poliestireno-divinilbenceno con ligando de fenilo), Flujo Rápido de Fenilsefarosa (sefarosa reticulada con ligando de fenilo), disponibles de Amersham-Pharmacia; t-butilo de Macroprep (metacrilato reticulado con ligando de t-butilo), y fenilo de Macroprep (metacrilato reticulado con ligando de fenilo) disponibles de Bio-Rad.
50

Lo más preferiblemente la matriz es Flujo Rápido de Fenilsefarosa de Amersham-Pharmacia (matriz rígida de perlas de 45-165 μm de sefarosa reticulada con ligando de fenilo).
55

Donde la etapa (b) es una etapa de cromatografía en fase reversa una matriz adecuada es un polímero tal como poliestireno, poliestireno-divinilbenceno, metacrilato reticulado, metacrilato modificado, que no lleva ningún ligando o lleva un ligando que tiene una hidrofobicidad mayor que la conferida por un grupo alquilo de C10.
60

Ejemplo de matrices adecuadas son CG300-M (poliestireno-divinilbenceno), CG161-M (poliestireno-divinilbenceno) disponibles de Tosohaas; Recurso 15RP (poliestireno-divinilbenceno), Recurso RPC (poliestireno-divinilbenceno), disponibles de Amersham-Pharmacia; Macroprep High S C18 (metacrilato reticulado con ligando de C18) disponible de Bio-Rad; Poros 50R1 y Poros 40R2 (poliestireno-divinilbenceno), disponibles de Perspective Biosystems.
65

ES 2 296 796 T3

En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la matriz en la que se lleva a cabo la cromatografía en fase reversa está constituida por perlas hidrófobas sintéticas. Preferiblemente, la matriz es una matriz de poliestirenodivinilbenceno, preferiblemente con perlas de 60-90 μm , más preferiblemente de 75 μm , y con un tamaño de poro mayor de 150 Å, preferiblemente un tamaño de poro de 300 Å.

Lo más preferiblemente, la matriz es una matriz de CG 300 M, disponible de TosoHaas (matriz de poliestireno, perlas de 75 μm con tamaño de poro promedio de 300 Å).

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención los contaminantes principales después de la cromatografía o microfiltración de lecho expandido, son los pigmentos de las células hospedadoras, que incluyen polifenoles y productos de degradación de los mismos.

La columna de intercambio catiónico de la etapa (c) se selecciona de tal forma que la proteína de EPI-HNE no precipita mientras que pasa a través de la columna. Con el fin de obtener un rendimiento alto, esta etapa se lleva a cabo preferiblemente a un pH entre 1,8 y 5,0 preferiblemente entre 2,0 y 3,0. La elución se lleva a cabo bajo condiciones tales como para obtener una concentración alta de EPI-HNE (durante 10 mg/ml) y fuerza iónica baja (menos de 25 ms/cm). Una elución tal se pudo obtener mediante "cromatografía de desplazamiento" usando un polication tal como polietilenoimina, polilisina, poliarginina o cualquier otro polímero, tal como por ejemplo polivinilpirrolidona (PVP), que contiene una densidad alta de cargas positivas a un pH entre 1,8 y 5. Se puede obtener el mismo resultado cargando un pico diluido después de la etapa (a) o (b) en un intercambiador catiónico débil a un pH entre 4,5 y 5,0 y mediante elución a pH 2,0 dado que el intercambiador catiónico débil no posee ninguna carga aniónica a tal pH ácido y no retiene más proteínas catiónicas.

Ejemplos de una matriz adecuada para la columna de intercambio catiónico incluyen matriz de Macroprep High S (matriz rígida basada en metacrilato reticulado que lleva grupos de superficie de sulfonato) de Biorad; Flujo Rápido de Sefarosa S. (agarosa reticulada que lleva grupos sulfonato) y Carboximetil Sefarosa (sefarosa entrecruzada que lleva grupos carboximetilo) de Amersham-Pharmacia.

La etapa (c) es una etapa de intercambio catiónico convencional que permite concentrar la proteína EPI-HNE para permitir su rendimiento alto y cristalización de velocidad alta si se usa la etapa (e) y, si se usa un solvente orgánico durante la etapa (b), eliminar trazas del mismo que no son aceptables para un producto farmacéutico.

El propósito de la etapa opcional (d) es eliminar todos los microorganismos tales como por ejemplo bacterias o levadura. Esta etapa es de particular importancia cuando las condiciones subsiguientemente usadas son capaces de causar crecimiento sustancial de microorganismos, por ejemplo cuando se lleva a cabo la etapa (e) durante un período de tiempo por encima de 3 horas. La filtración bajo condiciones estériles se lleva a cabo bajo condiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo a 0,22 μm .

En la etapa (e) la precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada se lleva a cabo adecuadamente en un vehículo acuoso a un pH comprendido entre 3,0 y 8,0, preferiblemente 4,0 y 6,0, lo más preferiblemente a un pH de 4,0 a 5,0, estando comprendida la concentración de la proteína EPI-hNE en el vehículo acuoso entre 1 y 80 mg/ml, preferiblemente entre 2 y 50 mg/ml.

La etapa (e) se lleva a cabo preferiblemente usando ciclos de cristalización/sonicación. La última efectivamente incrementa dramáticamente las cinéticas de precipitación, reduciendo de este modo sustancialmente el tiempo necesario para llevar a cabo la etapa (e).

El vehículo acuoso es adecuadamente una solución salina que tiene una presión iso-osmótica. La solución salina puede comprender acetato de sodio o de amonio y cloruro de sodio o de amonio, o citrato de sodio o de amonio.

El término "forma cristalizada" de EPI-HNE aquí quiere decir una forma insoluble de esa proteína que tiene una estructura en forma de vara y un tamaño principalmente por debajo de 10 μm .

Los cristales de EPI-HNE se recuperan mediante centrifugación o filtración.

Los cristales recuperados pueden suspenderse directamente en un tampón farmacéuticamente aceptable o secarse por congelación en un tampón adecuado tal como bicarbonato de amonio 10 mM o secarse por pulverización dentro de un polvo de aerosol.

Las proteínas de EPI-HNE se pueden seleccionar para purificarse de acuerdo con el procedimiento de la presente invención a partir del grupo constituido por EPI-HNE-1, EPI-HNE-2, EPI-HNE-3, y EPI-HNE-4. Se prefiere EPI-HNE-4.

La invención se ilustrará mediante los siguientes elementos.

Ejemplo 1

Purificación de EPI-HNE4 usando una ligera modificación del procedimiento descrito para purificar EPI-HNE3 en el ejemplo 13 del documento WO 96/20278

(Ejemplo Comparativo)

Sistema de producción de levadura

Los inhibidores de hNE se producen como proteínas segregadas en los sobrenadantes de cultivo de fermentaciones de cepa GS115 de *Pichia pastoris* de densidad celular alta. Los plásmidos de expresión se construyen ligando secuencias de DNA sintéticas que codifican el prepropéptido factor α de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* directamente al extremo 5' del DNA sintético que codifica el inhibidor de hNE deseado. Este gen de fusión está empotrado entre un promotor de gen *aox1* de *P. pastoris* inducible anteriormente en la cadena y secuencias de terminación de transcripción y poliadenilación de gen *aox1* más adelante en la cadena que se llevan en un plásmido que también codifica un gen *his4* de *S. cerevisiae*. Se incorpora DNA de plásmido de expresión linearizado mediante recombinación homóloga dentro del genoma de la cepa GS15 de *P. pastoris* mediante transformación esferoplástica. Los esferoplastos regenerados se seleccionan para cultivo en ausencia de histidina añadida. Los aislados individuales se rastrearon para fenotipo de utilización de metanol (mut +), niveles de secreción, y número de copias del gen. Se seleccionó la cepa PEY-53 que segrega un alto nivel de EPI-HNE-4 así. Esta cepa se estima mediante análisis de Southern de DNA genómico que contiene cuatro copias de DNA de plásmido de expresión integradas dentro del locus del gen *aox1*.

Producción de Proteínas

La cepa PEY-53 de *P. pastoris* se cultiva en fermentaciones de alimentación mixta de forma similar al procedimiento descrito en el documento WO 96/20278, con la diferencia de que el aire presurizado se usa en vez de oxígeno purificado. Brevemente, los cultivos se cultivan primero en modo de tandas con glicerol como la fuente de carbono. Después del agotamiento de glicerol, los cultivos se cultivan durante aproximadamente cuatro horas en modo de alimentación de glicerol limitado incrementando adicionalmente masa celular y desreprimiendo el promotor de *aox1*. En la fase de producción final, los cultivos se hacen crecer en modo de alimentación de metanol limitado. Durante esta fase, el promotor de *aox1* está totalmente activo y los inhibidores de hNE se segregan dentro del medio acondicionado (C.M.). La concentración final de EPI-HNE-4 en el C.M. de fermentación de PEY-53 fue aproximadamente 600 mg/l como se determina por el análisis de SDS-PAGE.

La especie molecular principal producida por cultivos de PEY-53 es la proteína EPI-HNE-4 apropiadamente procesada. Sin embargo, esta cepa también segrega aproximadamente 5-20% de una proteína procesada alternativamente que tiene peso molecular ligeramente superior.

Purificación de EPI-HNE-4

Se recogieron 2,5 l del C.M. de PEY-53 mediante centrifugación y el sobrenadante se sometió a microfiltro de 0,2 μ como se describe anteriormente. Se llevó a cabo una ultrafiltración de 30 KDa en el filtrado a través de microfiltro de 0,2 μ , y cuando el volumen de retentato se reduce a aproximadamente 250 ml, se lleva a cabo una diafiltración del retentato a un volumen de retentato constante (250 ml) durante 60 minutos a una velocidad de 10 ml/min. El volumen final resultante de filtrado de 30 Kda es aproximadamente 3 l.

EPI-HNE-4 apropiadamente procesado se purifica sustancialmente libre de forma alternativamente procesada y otros componentes de cultivo de fermentador mediante cromatografía de intercambio iónico en un gel de poliacrilamida que lleva grupos sulfonato (Macroprep 50S Biorad). Un volumen de lecho de 50 ml de Macroprep 50S se equilibra con citrato de sodio 10 mM a pH 3,5, el filtrado de ultrafiltración de 30 Kda aplicado a la columna (unión completa de EPI-HNE-4 a la columna se confirma demostrando la ausencia de actividad de inhibidor hNE en el eluato de columna), y la columna se lavó con diez volúmenes de columna de citrato de sodio 10 mM, a pH 3,5. La columna se eluyó después con un gradiente de acetato de amonio 10 mM a pH 3,5 a acetato de amonio 1M a pH 3,5 en volúmenes de 30 columnas. EPI-HNE-4 se eluye al final del gradiente como un pico simétrico individual. El eluato se secó por congelación.

Se obtuvieron así 300 mg de EPI-HNE4 purificado activo de 2,5 l de C.M. que corresponden a un rendimiento de aproximadamente el 20%.

El análisis de SDS-PAGE mostró una pureza del producto por encima del 95%. El contaminante principal fue un pigmento fluorescente verde.

Ejemplo 2

Purificación de EPI-HNE4 de acuerdo con el procedimiento de la invención en el que la etapa (b) es una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba

Se recogieron 100 l de C.M. de PEY-53 obtenidos como se describe en el ejemplo 1 y se hicieron pasar a través de un lecho expandido como sigue: 10 l de matriz cromatográfica (Streamline SP de Amersham-Pharmacia) se equilibraron en acetato de amonio 50 mM a pH 3,5 y se fluidizaron en el mismo tampón a 30 l a 300 cm/h. Después de cargar, la columna se lavó en el acetato de amonio 10 mM a pH 3,5 obteniéndose una absorción a 280 nm por debajo de 0,05. Las perlas se empaquetaron a 10 l y EPI-HNE-4 se recuperó lavando la columna en tampón de pH 4,5 de acetato de amonio 1 M.

Así se obtuvo una solución de 10 l que contiene aproximadamente 60 g de proteínas y pigmentos (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm y mediante ensayo de proteínas de Coomassie). HPLC-FR (columna de sílice Licrosphere 100RP de Pharmacia/gradiente de agua + TFA al 1% y acetonitrilo + TFA al 1%) mostró que la cantidad de EPI-HNE-4 fue sólo aproximadamente 30 g y la forma alternativamente procesada no se separó de la forma principal. La contaminación mediante contaminantes verdes es detectable.

La solución se filtró de forma estéril en un filtro de 22 μ m (Millipack 200 de Millipore) antes de purificación adicional.

La cromatografía de interacción hidrófoba se llevó a cabo haciendo pasar la solución de 10 l anterior en un sistema de BioProcess (Pharmacia), usando una matriz de Flujo Rápido de fenil-sefariosa de Pharmacia en una columna BPTG de 15 l de Pharmacia. Los tampones usados fueron A: 50 mM de acetato de sodio a pH 4,5 + NaCl 1M, y B: 50 mM de acetato de sodio a pH 4,5. La elución se llevó a cabo en una etapa a B al 100% con un caudal de 300 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 15 g de EPI-HNE4 purificado (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteína de Coomassie y ensayo de actividad biológica).

HPLC-FR mostró que la forma procesada alternativamente no se separó. No fue detectable ningún pigmento verde.

Se llevó a cabo después la cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema cromatográfico de Bioprocess de Pharmacia. La matriz usada fue matriz Macroprep High S de Biorad (matriz rígida basada en metacrilato reticulado que lleva grupos de superficie sulfonato), en una columna BPG200 de 15 l de Pharmacia. Los tampones usados fueron A: 10 mM de acetato de amonio a pH 3,5; B: 50 mM de acetato de sodio a pH 6,2 y C: 10 mM de bicarbonato de amonio a pH 7,8. Se usó una primera elución en tampón B para separar la forma procesada alternativamente. Se llevó a cabo después elución mediante etapa a C al 100% con un caudal de 300 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 12 g de EPI-HNE4 purificado (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteína de Coomassie y ensayo de actividad biológica), que corresponde a un rendimiento general del procedimiento de purificación de aproximadamente el 40%.

HPLC-FR mostró menos del 1,5% de la forma procesada alternativamente. No fue detectable ningún pigmento verde.

Ejemplo 3

Purificación de EPI-HNE4 de acuerdo al procedimiento de la invención en el que la etapa (b) es una etapa de cromatografía inversa

Se recogieron 100 l del C.M. de PEY-53 obtenidos como se describe en el ejemplo 1 y se hicieron pasar a través de un lecho expandido como sigue: 10 l de matriz cromatográfica (Streamline SP de Amersham-Pharmacia) se equilibraron en acetato de amonio 50 mM a pH 3,5 y se fluidizaron en el mismo tampón a 30 l a 300 cm/h. Después de cargar, la columna se lavó en el acetato de amonio 10 mM a pH 3,5 obteniéndose una absorción a 280 nm por debajo de 0,05. Las perlas se empaquetaron a 10 l y EPI-HNE-4 se recuperó lavando la columna en tampón de pH 4,5 de acetato de amonio 1 M.

Así se obtuvo una solución de 10 l que contiene aproximadamente 60 g de proteínas y pigmentos (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm y mediante ensayo de proteínas de Coomassie). HPLC-FR (columna de sílice Licrosphere 100RP de Pharmacia/gradiente de agua + TFA al 1% y acetonitrilo + TFA al 1%) mostró que la cantidad de EPI-HNE-4 fue sólo aproximadamente 30 g y la forma alternativamente procesada no se separó de la forma correcta. La contaminación mediante contaminantes verdes es detectable.

La solución se filtró de forma estéril en un filtro de 22 μ m (Millipack 200 de Millipore) antes de purificación adicional.

La cromatografía en fase inversa se llevó a cabo haciendo pasar la solución de 10 l anterior de un sistema de BioProcess (Pharmacia), usando una matriz de CG-300 M de Tosohaas en una columna de BTSS de 50 l de Pharmacia.

ES 2 296 796 T3

Los tampones usados fueron A: agua + TFA al 0,1%, y B: acetonitrilo + TFA al 0,1%, y B: acetonitrilo + TFA al 0,1%. El gradiente de columna fue 25-45% B en volumen de columna 40 y el caudal fue de 450 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 30 g de EPI-HNE-4 (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteínas de Coomassie y ensayo de actividad biológica).

HPLC-FR mostró menos del 2% de la forma procesada alternativamente. No fue detectable ningún pigmento verde.

Se llevó a cabo después cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema cromatográfico de Bioprocess de Pharmacia. La matriz usada fue matriz Macroprep High S de Biorad (matriz rígida basada en metacrilato reticulado que lleva grupos de superficie sulfonato), en una columna BPG100 de 5 l de Pharmacia. Los tampones usados fueron A: acetato de amonio 10 mM a pH 3,5, y B: bicarbonato de amonio 10 mM a pH 7,8. Se llevó a cabo elución mediante etapa a B al 100% y el caudal fue de 300 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 25 g de EPI-HNE4 purificado (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteína de Coomassie y ensayo de actividad biológica), que corresponden a un rendimiento general del procedimiento de purificación de aproximadamente el 40%.

HPLC-FR mostró menos del 2% de la forma alternativamente procesada. No fue detectable pigmento verde.

Sólo estuvieron presentes trazas de acetonitrilo.

Estas trazas de acetonitrilo se eliminaron completamente bien mediante secado por congelación o bien mediante diafiltración.

Ejemplo 4

Purificación de EPI-HNE4 de acuerdo con el procedimiento de la invención en el que la etapa (b) es una etapa de cromatografía inversa y se usa la etapa (e)

Se recogieron 100 l de la C.M. de PEY-53 obtenida como se describe en el ejemplo 1 y se hicieron pasar a través de un lecho expandido como sigue: 10 l de matriz cromatográfica (Streamline SP de Amersham-Pharmacia) se equilibraron en acetato de amonio 50 mM a pH 3,5 y se fluidizaron en el mismo tampón a 30 l a 300 cm/h. Después de cargar, la columna se lavó en el acetato de amonio 10 mM a pH 3,5 obteniéndose una absorción a 280 nm por debajo de 0,05. Las perlas se empaquetaron a 10 l y EPI-HNE-4 se recuperó lavando la columna en tampón de pH 4,5 de acetato de amonio 1 M.

Así se obtuvo una solución de 10 l que contiene aproximadamente 60 g de proteínas y pigmentos (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm y mediante ensayo de proteínas de Coomassie). HPLC-FR (columna de sílice Licrosphere 100RP de Pharmacia/gradiente de agua + TFA al 1% y acetonitrilo + TFA al 1%) mostró que la cantidad de EPI-HNE-4 fue sólo aproximadamente 30 g y la forma alternativamente procesada no se separó de la forma correcta. La contaminación mediante contaminantes verdes es detectable.

La solución se filtró de forma estéril en un filtro de 22 μ m (Millipack 200 de Millipore) antes de purificación adicional.

La cromatografía en fase inversa se llevó a cabo haciendo pasar la solución de 10 ml anterior en un sistema de Bioprocess (Pharmacia), usando una matriz CG-300 M de Tosohaas en una columna BTSS de 50 l de Pharmacia. Los tampones usados fueron A: agua + TFA al 0,1%, y B: acetonitrilo + TFA al 0,1%. La columna se lavó en B al 25% lavándose los pigmentos verdes y el compuesto no identificado así en B al 60% eluyendo la proteína EPI-hNE-4. El caudal fue de 450 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 25 g de EPI-HNE-4 purificado (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteínas de Coomassie y ensayo de actividad biológica).

HPLC-FR mostró que la forma procesada alternativamente se conservó. No fue detectable ningún pigmento verde.

Se llevó a cabo después la cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema cromatográfico de Bioprocess de Pharmacia. La matriz usada fue matriz Macroprep High S de BiorRad (matriz rígida basada en metacrilato reticulado que lleva grupos de superficie sulfonato), en una columna XK50 de 0,5 l de Pharmacia. Los tampones usados fueron A: 10 mM de acetato de sodio a pH 2,0, y B: acetato de sodio 10 mM a pH 0,2 + 1% de imina de polietileno. Se llevó a cabo la elución por etapas a B al 100% y el caudal fue de 300 cm/h.

El eluato contenía aproximadamente 50 g de EPI-HNE-4 purificado (como se determina mediante ensayo espectrométrico a 280 nm, ensayo de proteínas de Coomassie y ensayo de actividad biológica).

El eluato contenía aproximadamente 50 mg/ml de EPI-hNE-4 a fuerza iónica baja (15 ms/cm).

ES 2 296 796 T3

El pH de este eluato se incrementó a pH 4,5 con hidróxido de sodio 1 M y se dejó cristalizar durante toda una noche.

Los cristales se recuperaron mediante centrifugación (30 min, 10.000 g) y se resuspendieron en tampón de bicarbonato de amonio 10 mM antes de secado por congelación.

Se recuperaron así 20 g de EPI-hNE-4, que corresponden a un rendimiento general del procedimiento de purificación de aproximadamente el 66%.

HPLC-FR mostró menos del 5% de la forma procesada alternativamente. Ningún pigmento verde ni ningún material que absorba a la longitud de onda de 200 nm fue detectable.

Ejemplo 5

Purificación de EPI-HNE4 de acuerdo al procedimiento de la invención en el que la etapa opcional (b) no se usa y la etapa (e) se usa

Este ejemplo destacará la ventaja de usar etapa (e). Dado que la purificación mediante etapa de cristalización (e) es muy eficiente en eliminar los pigmentos verdes, la etapa (b) parece no ser necesaria cuando se usa la etapa (e).

Las condiciones experimentales son las mismas que en el ejemplo 4, excepto por la etapa (b) que no se usa. En la etapa (e), se introdujeron varios ciclos de sonicación/cristalización.

Las cantidades de EPI-HNE4 obtenidas después de la etapa (a), la etapa (c) y la etapa (e) durante 4 actuaciones de fermentación que usan diferentes volúmenes de caldo de fermentación se exponen en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

<u>VOLUMEN DE CALDO DE FERMENTACIÓN</u>	<u>EPI-HNE4 después de la fermentación (g)</u>	<u>Después de la etapa (a)</u>	<u>Después de la etapa (c)</u>	<u>Después de la etapa (e)</u>	<u>Rendimiento de purificación general en %</u>
1 l	0,3	0,29	0,32	0,18	60
10 l	3	2,95	2,9	1,2	40
50 l	5*	5	5	2,8	56
100 l	30	29,4	29,2	14	46
* El nivel de expresión de EPI-HNE4 fue excepcionalmente bajo (100 mg/l en vez de 300 mg/l) debido a la configuración de la fermentación de 50 l usada, no adaptada a fermentación de levadura.					

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de proteínas EPI-HNE, a partir del medio de cultivo de una cepa huésped para la expresión de dichas proteínas, que comprende las etapas de:
 - (a) hacer pasar una parte derivada de un medio de cultivo sobre un lecho expandido de adsorbente de intercambio catiónico, con el fin de recuperar un eluato,
 - (b) llevar a cabo opcionalmente la separación cromatográfica de proteínas, de acuerdo con su hidrofobicidad, en el eluato resultante,
 - (c) hacer pasar el eluato resultante a través de una columna de intercambio catiónico,
 - (d) opcionalmente filtrar el medio resultante para obtener un filtrado estéril, y
 - (e) opcionalmente causar la precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada y recuperar los cristales de proteína.
2. Procedimiento para la purificación de proteínas EPI-HNE, a partir del medio de cultivo de una cepa huésped para la expresión de dichas proteínas, que comprende las etapas de:
 - (a) hacer pasar una parte derivada de un medio de cultivo sobre un lecho expandido de adsorbente de intercambio catiónico o una micromembrana inerte mecánicamente y químicamente, con el fin de recuperar un eluato,
 - (b) llevar a cabo opcionalmente separación cromatográfica de proteínas, de acuerdo con su hidrofobicidad, en el eluato resultante,
 - (c) hacer pasar el eluato resultante a través de una columna de intercambio catiónico,
 - (d) opcionalmente filtrar el medio resultante para obtener un filtrado estéril, y
 - (e) opcionalmente causar precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada y recuperar los cristales de proteína.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa (c) se lleva a cabo a un pH entre 1,8 y 5,0, preferiblemente entre 2,0 y 3,0.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la elución en la etapa (c) se lleva a cabo cargando un pico diluido después de la etapa (a) o (b) en un intercambiador catiónico débil a un pH entre 4,5 y 5,0 y por elución a un pH 2,0.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la elución se obtiene mediante cromatografía de desplazamiento.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la etapa (e) se lleva a cabo la precipitación de EPI-HNE en una forma cristalizada en un vehículo acuoso a un pH entre 3,0 y 8,0, preferiblemente entre 4,0 y 6,0.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la concentración de EPI-HNE en el vehículo acuoso es de 1 a 80 mg/ml, preferiblemente de 2 a 50 mg/ml.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa (e) se lleva a cabo usando ciclos de cristalización/sonicación.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (b) es una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba donde la matriz es un polímero que lleva un ligando que tiene una hidrofobicidad entre la hidrofobicidad conferida por un grupo alquilo de C₂ y la hidrofobicidad conferida por un grupo alquilo de C₈.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la matriz es un polímero que lleva un ligando seleccionado del grupo constituido por etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terciobutilo, pentilo, isopentilo, hexilo, fenilo, isopropanol, isobutanol, éter C₄-C₆, preferiblemente fenilo.
11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (b) es una etapa de cromatografía en fase inversa llevada a cabo en una matriz compuesta de perlas hidrófobas sintéticas.

ES 2 296 796 T3

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la matriz es una matriz de poliestireno-divinilbenceno, preferiblemente con perlas de 60-90 μm , más preferiblemente 75 μm , y con un tamaño de poro mayor de 150 Å, preferiblemente un tamaño de poro de 300 Å.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65