



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 539**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06010184 .7**
96 Fecha de presentación : **05.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1714982**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **Procedimientos relativos a la purificación de proteínas altamente aniónicas.**

30 Prioridad: **05.06.2001 US 296402 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2009

73 Titular/es: **Genetics Institute, L.L.C.**
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, Massachusetts 02140, US

72 Inventor/es: **Coffmann, Jonathan L.;**
Foster, William B. y
Sun, Shujun

74 Agente: **López Marchena, Juan Luis**

ES 2 321 539 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos relativos a la purificación de proteínas altamente aniónicas.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para disociar moléculas que contengan un Fc a partir de
10 complejos de proteína A/moléculas que contengan Fc en mezclas.

Antecedentes de la técnica relacionada

La purificación de productos objetivo suele tener la dificultad de una eliminación deficiente del ADN debido a
15 las interacciones de ADN/proteína. Las interacciones de ADN/proteínas son más problemáticas en la purificación de
proteínas objetivo altamente aniónicas, v.g., proteínas sulfatadas. La purificación de las proteínas, v.g., proteínas que
contienen dominios de inmunoglobulina, es también frecuentemente difícil sobre la base del bajo pH de disociación
exigido para separar las moléculas que contienen Fc respecto a la proteína A. La identificación de procedimientos
útiles para la eliminación del ADN desde las proteínas objetivo y la identificación de procedimientos para eliminar la
20 proteína A desde las proteínas objetivo sería muy ventajoso en la purificación de diversas proteínas.

La publicación internacional, documento WO 01/72796, da a conocer procedimientos para aislar y purificar pro-
teínas objetivo altamente aniónicas y proteínas objetivo que comprenden dominios de inmunoglobulina, por ejemplo,
proteínas sulfatadas. Las proteínas aniónicas son proteínas que tienen una carga negativa neta. Las proteínas sulfatadas
25 son proteínas en las que la carga negativa neta se debe a por lo menos un (1) residuo sulfatado. La sulfatación de una
proteína objetivo se refiere a la sustitución de al menos un grupo hidroxilo (-OH) con -SO₃H en, o entre, aminoácidos
contenidos dentro de la proteína objetivo. En una forma de realización preferida, la proteína sulfatada tiene al menos
un (1) grupo de sulfatos. Las proteínas sulfatadas que contienen al menos dos (2), tres (3), cuatro (4), cinco (5), seis
(6) o más grupos de sulfatos son también cubiertas por los presentes procedimientos, v.g., seis grupos sulfato en las
30 tirosinas N-terminales según se materializa en PSGL-1 (Ligando de glicoproteína de P-selectina-1).

En particular, el documento de publicación internacional WO 01/72769 da a conocer, en un aspecto, un proce-
dimiento para purificar proteínas objetivo altamente aniónicas, que comprende las etapas de cromatografía de in-
tercambio iónico bajo condiciones adecuadas para la purificación de las proteínas objetivo. A modo de ejemplo, el
35 procedimiento dado a conocer consiste en (1) poner en contacto la muestra con un sustrato capaz de ligar, de forma
reversible, moléculas cargadas, en el que las proteínas objetivo se ligan con el sustrato, (2) lavar el sustrato con una
primera solución de lavado bajo condiciones adecuadas, en el que una pluralidad de impurezas proteínicas y no
proteínicas en la muestra no están ligadas o son retiradas por lavado desde el sustrato, mientras que las proteínas
objetivo altamente aniónicas permanecen ligadas (3) eluir la muestra con una primera solución de elución, en el que
40 la primera solución de elución comprende una solución salina a una alta concentración molar y (4) recoger la muestra
eluida que contiene las proteínas objetivo aniónicas purificadas.

En una forma de realización, se da a conocer que el pH de la primera solución de lavado es de aproximadamente 4,0
a 8,0. En otra forma de realización, se da a conocer que el pH de la primera solución de lavado es de aproximadamente
45 6,5.

En una forma de realización preferida, se da a conocer que la proteína objetivo altamente aniónica es una proteína
sulfatada y las impurezas incluyen una forma sulfatada de la proteína objetivo.

La publicación internacional WO 01/72769 da a conocer, además, que la muestra eluida procedente de la purifica-
ción de cromatografía de intercambio iónico, que contiene las proteínas objetivo purificadas se puede purificar todavía
más. Esta purificación adicional, por ejemplo, comprende las etapas de interacción hidrofóbica y/o cromatografía de
quelatos metálicos bajo condiciones adecuadas para la purificación de las proteínas objetivo altamente iónicas. Por
ejemplo, la nueva purificación está constituida por las etapas de (1) hacer pasar la muestra eluida, que contiene las
55 proteínas objetivo, a través de una columna de cromatografía de quelatos metálicos o una columna de cromatografía
de interacción hidrofóbica, en donde la muestra eluida es capturada en la columna, (2) lavado de la columna con una
segunda solución de lavado bajo condiciones adecuadas, de modo que se disocien los complejos de ADN/histonas
contenidos en la muestra, (3) eluir la muestra con una segunda solución de elución y (4) recoger la muestra eluida que
contiene las proteínas objetivo altamente aniónicas purificadas.

En una forma de realización dada a conocer, la segunda solución de lavado comprende una alta concentración
salina y la segunda solución de elución comprende una más baja concentración salina que la segunda solución de
lavado. Por ejemplo, bajo condiciones cromatográficas de interacción hidrofóbica, la concentración de la sal en la
segunda solución de lavado es de aproximadamente 4 M y la concentración de la sal en la segunda solución de elución
65 es de aproximadamente 0,48 M. Como alternativa, bajo cromatografía de interacción hidrofóbica, la segunda solución
de lavado se selecciona a partir del grupo constituido por: (a) una solución que contiene NaCl a una concentración
aproximada de 4 M y Tris a aproximadamente 2 mM y un pH de 7,4. (b) una solución que comprende isopropanol a
aproximadamente un 5% y sulfato amónico a aproximadamente 1,2 M, (c) una solución de etanol a aproximadamente

5% y sulfato amónico de aproximadamente 1,2 M y (d) una solución de etanol a aproximadamente 5% y NaCl a aproximadamente 4 M.

Además, se da a conocer que bajo las condiciones de cromatografía de quelatos de hierro, por ejemplo, la segunda solución de lavado comprende una concentración de sal de aproximadamente 2 M y la segunda solución de elución comprende una concentración salina de aproximadamente 200 mM a 1 M. Como alternativa, bajo condiciones cromatográficas de celación de hierro, la segunda solución de lavado comprende MES a aproximadamente 40 mM, NaCl a aproximadamente 2 M de imidazol a aproximadamente 5 mM y la segunda solución de elución comprende una solución de MES a aproximadamente 40 mM, NaCl a aproximadamente 1 M e imidazol a aproximadamente 35 mM.

La publicación internacional, documento WO 01/72769, da a conocer que las proteínas objetivo tienen al menos una (1) sulfatación. Además, se da a conocer proteínas objetivo aniónicas que tienen al menos dos (2), tres (3), cuatro (4), cinco (5), seis (6) o más sulfataciones, v.g., proteínas PSGL-1. Las proteínas aniónicas capaces de ser purificadas por los procedimientos dados a conocer pueden ser proteínas naturalmente presentes o recombinantes.

En la publicación internacional WO 01/72769 se da a conocer, además, un procedimiento para la purificación de proteínas altamente aniónicas que comprende un dominio de inmunoglobulina (v.g., un dominio Fc de inmunoglobulina), por ejemplo, una proteína de fusión PSGL-Ig. Este procedimiento dado a conocer comprende las etapas de: (1) poner en contacto la muestra con un sustrato capaz de enlazar la parte Fc de la proteína objetivo, que comprende un dominio de inmunoglobulina, de modo que las moléculas objetivo enlacen con el sustrato, (2) lavar el sustrato con una primera solución de lavado bajo condiciones adecuadas para eliminar por lavado los contaminantes contenidos en la muestra, (3) eluir la muestra con una primera solución de elución que contiene las proteínas objetivo aniónicas purificadas. Además, se da a conocer que la muestra eluida procedente del sustrato de enlace Fc, que contiene las proteínas objetivo altamente aniónicas que comprenden un dominio de inmunoglobulina pueden purificarse todavía más. Por ejemplo, una purificación adicional comprende las etapas de: (1) poner en contacto la muestra eluida que contiene las proteínas objetivo aniónicas purificadas, que comprende un dominio de inmunoglobulina, con un sustrato capaz de crear un enlace reversible de moléculas cargadas, de modo que una pluralidad de impurezas proteináceas no proteináceas, en la muestra, no se enlacen o sean eliminadas por lavado desde el sustrato, mientras las proteínas objetivo permanecen ligadas al sustrato, (2) lavar el sustrato con una segunda solución de lavado en la que el pH de dicha solución de lavado sea bajo, por ejemplo, aproximadamente 4,0, preferentemente 3,8, (3) eluir la muestra con una segunda solución de elución y (4) recoger la muestra eluida que contiene las proteínas objetivo aniónicas purificadas, que comprenden un dominio de inmunoglobulina.

En un aspecto de la invención se da a conocer que las proteínas objetivo que comprenden un dominio de inmunoglobulina presentan al menos una (1) sulfatación. En la publicación internacional WO 01/72769 se dan a conocer también inmunoglobulinas que comprenden proteínas con al menos dos (2), tres (3), cuatro (4), cinco (5), seis (6) o más sulfataciones, v.g., PSGL-Ig.

En una forma de realización preferida, los procedimientos de purificación dados a conocer proporcionan proteínas objetivo altamente aniónicas purificadas y proteínas altamente aniónicas purificadas que comprenden un dominio de inmunoglobulina (v.g., PSGL-Ig) siendo al menos un 99,9% pura de proteínas contaminantes.

En otra forma de realización dada a conocer, los procedimientos de purificación de la invención eliminan al menos un 95% o un valor de eliminación de $2,5 \log_{10}$ (LRV) del ADN contaminante a partir de las proteínas objetivo altamente aniónicas y de las proteínas altamente aniónicas que comprenden un dominio de inmunoglobulina.

La publicación internacional WO 95/22389 A1 se refiere a la aplicación de la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) a la separación de monómeros de inmunoglobulina G y a la integración de HIC en un protocolo cromatográfico de combinación para la purificación de las moléculas de anticuerpos IgG. El anticuerpo IgG monomérico purificado, libre de agregados de inmunoglobulina, con proteína de células huésped y proteína A pueden recuperarse en el proceso.

Además, la publicación internacional WO 00/43781 A2 da a conocer que las proteínas híbridas de receptor/Fc son purificadas utilizando una columna de proteína A Sefarosa. Las proteínas contaminantes pueden eliminarse por una posterior etapa de cromatografía de quelato-níquel.

Sin embargo, un procedimiento para disociar moléculas que contengan Fc respecto a los complejos de moléculas que contienen proteína A/Fc, en mezclas, sería muy deseable.

Resumen de la invención

La presente invención da a conocer un procedimiento para eliminar proteína A (v.g., rProteína o rPA) de las mezclas que las contienen asociadas, por ejemplo, por interacciones hidrofóbicas. Las moléculas que contienen proteína A y Fc, tal como por ejemplo moléculas de rPSGL-Ig. La elevación del pH de la disociación, entre pH 5,0 y 5,7, permite la separación de las moléculas que contienen Fc, tal como rPSGL-Ig respecto a la proteína A haciendo pasar la mezcla a través de una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC) eliminando, de este modo, la proteína A desde la mezcla. Las condiciones de disociación se establecen por la adición de un agente que reduce (descompone) o inhibe (impide) las interacciones hidrofóbicas, que es etileno glicol. Una condición de disociación con un pH entre

5,0 y 5,7, permite la eliminación de rPA a un pH más normal que de otro modo ocurriría con la disociación. El uso de un pH, entre 5,0 y 5,7 da lugar, además, a menos daños, v.g., pérdida de sulfatación o sialación o introducción de segmentaciones de Asp-Pro, para algún Fc que contiene proteínas debido a un pH más bajo, v.g., pH 3,7.

Anteriormente, no se podían utilizar columnas de IMAC bajo condiciones de disociación, por ejemplo, bajo pH, una vez más debido a que el Fc que contiene la molécula y el rPA no permanecerían ligados a la IMAC bajo el pH normalmente bajo necesario para que se produzca la disociación. Mediante el establecimiento de las condiciones de disociación utilizando etileno glicol, el Fc que contiene la proteína permanece ligado a la columna IMAC, de modo que esta columna se utiliza para la eliminación de rProteína A. las condiciones de disociación establecidas mediante la adición de un agente a dicha mezcla, que reduce o inhibe las interacciones hidrofóbicas, que es el etileno glicol. La invención da a conocer un procedimiento para disociar Fc que contiene moléculas respecto a complejos de moléculas que contienen A/Fc en una mezcla que comprende poner en contacto la mezcla con una columna cromatográfica de quelatos metálicos (IMAC) bajo condiciones de pH entre 5,0 y 5,7, en donde las condiciones del pH se establecen mediante la adición de etileno glicol a dicha mezcla para disociar las moléculas que contienen Fc respecto a los complejos de las moléculas que contienen proteína A/Fc. Preferentemente, las condiciones del pH son 5,7 en otra forma de realización. En otra forma de realización, se realiza una solución tampón que contiene 50% de etileno glicol. En otra forma de realización, la columna de IMAC es lavada con una solución tampón que contiene etileno glicol al 50%, 1 M NaCl y 20 mM de acetato sódico, a un pH de 5,0, con lo que se disocian los complejos de moléculas que contienen proteína A/Fc. En otra forma de realización, el procedimiento de la invención comprende, además, eluir las moléculas que contienen Fc desde la columna cromatográfica de quelatos metálicos, de modo que contenga moléculas que estén sustancialmente libres de proteína A.

En otra forma de realización, la molécula que contiene Fc es rPSGL-Ig.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada, al menos en parte, en dar a conocer un nuevo procedimiento para purificar proteínas objetivo altamente aniónicas y proteínas altamente aniónicas que comprenden un dominio de inmunoglobulina, por ejemplo, inalambricas sulfatadas (v.g., PSGL-1). Las proteínas aniónicas son proteínas que tienen una carga negativa neta. Las proteínas sulfatadas son proteínas aniónicas en las que la carga negativa se debe a por lo menos una, o preferentemente más, cinco (5) o más, sulfataciones, v.g., al menos seis (6) sulfataciones. Las sulfataciones en una proteína objetivo se refieren a la sustitución de al menos un grupo hidroxilo (-OH) con -SO₄H en o entre aminoácidos contenidos dentro de la proteína objetivo. Las sulfataciones pueden ocurrir, por ejemplo, en las tirosinas de terminales N según se materializa en PSGL-1.

La presente invención está basada, también en parte, en dar a conocer un nuevo procedimiento para extraer la proteína A (v.g., rProteína A o rPA) de mezclas que contienen asociadas, por ejemplo, mediante interacciones hidrofóbicas, moléculas que contienen proteína A y Fc, tales como, por ejemplo, moléculas de rPSGL-Ig usando condiciones del pH entre 5,0 y 5,7 que permite la separación de las moléculas que contienen Fc, tales como la rPSGL-Ig respecto a la proteína A, haciendo pasar la mezcla a través de una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC), realizándose, de este modo, la retirada de la proteína A desde la mezcla. El pH de disociación se eleva añadiendo un agente que reduce (descompone) o inhibe (impide) las interacciones hidrofóbicas que es etileno glicol. Un pH más alto de disociación permite la extracción de rPA a un pH más neutro que el que se produciría de otro modo en la disociación. El uso de un pH entre 5,0 y 5,7 produce también menos daño, por ejemplo, pérdida de sulfatación sialación o introducción de segmentaciones de Asp-Pro, para algún fragmento Fc que contiene proteínas debido a un más bajo pH, v.g., pH 3,7.

Las condiciones de pH preferidas para la disociación de moléculas que contienen proteína A y Fc incluyen las gamas de pH de 5,2-5,7 y 5,5-5,7. Las condiciones de pH preferidas para la disociación de moléculas que contienen proteína A y Fc incluyen condiciones con un pH de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6 y 5,7. Una condición particularmente preferida para la disociación de moléculas que contienen proteína A y Fc es un pH de 5,0.

En la presente invención se utiliza etileno glicol para disociar moléculas que contienen proteína A y Fc. Composiciones o agentes que reducen (descomponen) o inhiben (impiden) interacciones hidrofóbicas se pueden utilizar a cualquier concentración lo que aumenta, de forma satisfactoria, el pH suficientemente para permitir la separación del complejo de moléculas que contienen proteína A/Fc utilizando una columna cromatográfica e incluyendo, por ejemplo, gamas de concentraciones de etileno glicol entre 10%-50%, 10%-40%, 20%-40% y 20%-30%. Concentraciones preferidas de etileno glicol que reducen (descomponen) o inhiben (impiden) interacciones hidrofóbicas incluyen 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% y 50%. Particularmente preferido para la disociación de compuestos que contienen Fc, v.g., rPSGL-Ig y proteína A es el etileno glicol a una concentración del 50%.

La columna de IMAC se utiliza para separación de moléculas que contienen Fc, v.g., rPSGL-Ig respecto a la proteína A, cuando se utilizan con un pH suficiente para extraer una cantidad sustancial de proteína A. Las moléculas

ES 2 321 539 T3

que contienen proteína A y Fc se disocian utilizando una columna de IMAC en condiciones del pH entre 5,0 y 5,7, preferentemente un pH de 5,0, en donde las condiciones del pH se establecen mediante la adición de etileno glicol a dicha mezcla. Preferentemente, se utiliza una solución tampón que contiene un 50% de etileno glicol para elevar el pH de la disociación. En una forma de realización particularmente preferida, una columna de IMAC es objeto de lavado con una solución tampón que contiene un 50% de etileno glicol, 1 M NaCl y 20 mM de acetato de sodio, a un pH de 5,0 para disociar el rPA de las moléculas que contienen Fc enlazadas, por ejemplo, rPSGL-1, con la consiguiente extracción de una parte importante del rPA desde las moléculas que contienen Fc utilizando una columna de IMAC.

Tal como aquí se utiliza, el término “extracción de una cantidad sustancial” de proteína A se refiere a la extracción del 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90% o preferentemente 90%-100% de proteína A desde los complejos de moléculas que contienen proteína A/Fc. Preferentemente, se extrae un 10%, 20%, 30%, 40 p, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de proteína A.

Tal como aquí se utiliza, la extracción de proteína A, de modo que las moléculas que contienen Fc estén sustancialmente libres de proteína A se refiere a la extracción de 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90% o, preferentemente, 90%-100% de proteína A desde los complejos de moléculas que contienen proteína A/Fc, v.g., en una mezcla. Preferentemente, se extrae un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de proteína A.

En una forma de realización preferida, la proteína sulfatada es PSGL-1, por ejemplo, PSGL-1 que comprende el aminoácido dado a conocer en la patente de los Estados Unidos n° 5.827.817, cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia o una parte activa del mismo. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína PSGL-1 (es decir, el péptido maduro más la secuencia líder se caracteriza por la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente de los Estados Unidos n° 5.827.817 respecto al aminoácido 1 hasta el aminoácido 402 y aquí establecida como secuencia SEQ ID N° 1. El análisis de hidrofobicidad y la comparación con patrones de segmentación conocidos predicen una secuencia señal de 20 a 22 aminoácidos, es decir, los aminoácidos 1 a 20 o los aminoácidos 1 a 22 de PSGL-1. PSGL-1 contiene un sitio de segmentación PACE (aminoácidos básicos apareados que convierten las enzimas) (-Arg-Asp-Arg-Arg) en residuos de aminoácidos 38-41. La proteína PSGL-1 madura está caracterizada por la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID n° 1 desde el aminoácido 42 al aminoácido 402. Una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina se caracteriza por los aminoácidos 21 a 310 de la secuencia de aminoácidos establecida en la patente los Estados Unidos n° 5.827.817. Otra forma soluble de la proteína PSGL-1 madura se caracteriza por la secuencia de aminoácidos establecida en la patente de los Estados Unidos n° 5.827.817 desde el aminoácido 42 al aminoácido 310. La forma soluble de la proteína ligando de P-selectina, se caracteriza, además, por ser soluble en una solución acuosa a la temperatura ambiente.

Proteínas de fusión de PSGL-1 (v.g., PSGL-Ig) se pueden obtener utilizando las enseñanzas reconocidas en esta técnica y utilizando las enseñanzas de la patente de los Estados Unidos n° 5.827.817 incorporada aquí por referencia. Los fragmentos de la proteína PSGL-1 pueden ser objeto de fusión a las moléculas portadoras tales como inmunoglobulinas, para aumentar la valencia de los sitios de enlace de ligandos de P-selectina. Por ejemplo, formas solubles de la proteína ligando de P-selectina, tal como los fragmentos desde el aminoácido 42 al aminoácido 295 o desde el aminoácido 42 al aminoácido 88 de la secuencia SEQ ID N° 1 pueden ser objeto de fusión a través de secuencias de “ligantes” a la parte de Fc de una inmunoglobulina (secuencia nativa o secuencias mutadas para conferir propiedades deseables (tales como inmunogenicidad reducida o semi-vida más larga) a la proteína quimera resultante). Para una forma trivalente de la proteína ligando de P-selectina, tal fusión podría ser para el segmento Fc de una molécula de IgG (v.g. rPSGL-Ig). Otros isotipos de inmunoglobulina se pueden utilizar también para generar dichas fusiones. Por ejemplo, una fusión de IgM-proteína ligando de P-selectina generaría una forma decavalente de la proteína ligando de P-selectina según la invención.

Tal como aquí se utilizan, los términos “proteína que contiene Fc” o “molécula que contiene Fc” incluyen cualquier proteína que sea objeto de fusión con o incluya un fragmento Fc de una inmunoglobulina. Un ejemplo de una proteína que contiene Fc es rPSGL-Ig.

PSGL-1 es una glicoproteína que puede contener uno o más de los carbohidratos terminales siguientes:

NcuAca(2,3) Gal β (1,4) GlcNAc-R

/ α (1,3)

NcuAca(2,3) Gal β (1,3) GlcNAc-R

/ α (1,4)

Fuc

Gal β (1,4) GlcNAc-R

/ac (1,3)

Fuc

Gal β (1,3) GicNAc-R

5 / α (1,4)

Fuc

10 donde R = el resto de la cadena de carbohidratos, que está unida por enlaces covalentes directamente a la proteína ligando de P-selectina o a un segmento específico de molécula de lípidos que está unida, de forma covalente, a la proteína ligando de P-selectina. PSGL-1 se puede sulfatar adicionalmente o de cualquier otro modo, modificarse después de la traslación. Según se expresa en las células de COS y CHO, la proteína ligando de P-selectina de longitud total P es una proteína homodimérica que tiene un peso molecular aparente de 220 kD según se indica por la electroforesis de geles de SDS-poliacrilamida no reductora.

15 La estructura de la PSGL-1 de longitud completa incluye un dominio extracelular (desde el aminoácido 21 al 310), un dominio de transmembrana (desde aproximadamente el aminoácido 311 a 332), un dominio citoplásmico intracelular (desde aproximadamente el aminoácido 333 al 402). El dominio extracelular contiene tres sitios de tripéptidos de consenso (Asn-X-Ser/Thr) de potencial glicosilación N-ligada comenzando en los residuos de Asn 65, 111 y 292. El dominio extracelular contiene tres potenciales sitios de sulfatación de tirosina en los residuos 46, 48 y 51. La zona constituida por los residuos 55-267 contiene un alto porcentaje de prolina, serina y treonina incluyendo un subdominio de quince repeticiones decaaméricas de la secuencia de consenso de diez aminoácidos Ala-Thr/Met-Glu-Ala-Gln-Thr-Thr-X-Pro/Leu-Ala/Thr, en donde X puede ser Pro, Ala, Gln, Glu o Arg. Las zonas tales como estas son características de las proteínas altamente O-glicosiladas.

25 Se pueden realizar supresiones sustanciales de la secuencia de PSGL-1 mientras se mantiene la actividad de la proteína ligando de P-selectina. Por ejemplo, PSGL-1 que comprende la secuencia del aminoácido 42 al aminoácido 189, la secuencia desde el aminoácido 42 al aminoácido 118 o la secuencia desde el aminoácido 42 al aminoácido 80 de SEQ ID n° 1, conservando cada una la actividad de enlace de proteínas de P-selectina y la capacidad para el enlace de la proteína PSGL-1 de P-selectina en la que uno o más sitios de N-glicosilación enlazada (tales como los situados en los aminoácidos 65, 111 y 292) han sido cambiados a otros aminoácidos o suprimidos conservando también la actividad de enlace de las proteínas de P-selectina y la capacidad para el enlace de P-selectina. Las proteínas de ligando de P-selectina, que comprende desde el aminoácido 42 al aminoácido 60 (que incluye una zona altamente aniónica de la proteína desde el aminoácido 45 al aminoácido 58) conservan también la actividad de proteínas ligando de P-selectina; sin embargo, las proteínas de ligandos de P-selectina, limitadas a dicha secuencia, no enlazan con la P-selectina. Preferentemente, una proteína ligando de P-selectina retiene al menos uno (más preferentemente al menos dos y todavía más preferentemente tres) de los residuos de tirosina encontrados en los aminoácidos 46, 48 y 51 cuya sulfatación puede contribuir a la actividad de proteínas ligandos de P-selectina.

40 Esta invención se ilustra todavía más por los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos. Todas las referencias a la secuencia de aminoácidos de PSGL-1 están basadas en la secuencia de aminoácidos de PSGL-1 establecida en la patente de los Estados Unidos n° 5.827.817 y en la presente como SEQ ID n° 1.

Ejemplos

45 Procedimientos: Procedimientos generales para purificar proteínas se encuentran en Janson J.C. y L. Ryden (eds.) Principios de purificación de proteínas, procedimientos de alta resolución y aplicaciones, VHC Publishers, Inc. New York (1989), patente de u 5.429.746 titulada "Purificación de anticuerpos" y la patente de Estados Unidos n° 5.115.101 titulada "Extracción de proteína desde preparaciones de anticuerpos".

Ejemplo 1

Purificación de proteína de fusión PSGL-Ig recombinante-proceso I (para fines ilustrativos solamente)

55 Este ejemplo describe la purificación de una proteína de fusión PSGL-Ig recombinante mediante cromatografía de columnas.

Una proteína ligando de P-selectina soluble fue expresada en células de CHO y los medios acondicionados fueron recogidos para la purificación de las proteínas. La columna de flujo rápido A Q Sepharose™ (Amersham Pharmacia), con una profundidad de lecho de 8 cm, fue preparada según las instrucciones del fabricante. La capacidad de la columna para PSGL en medios acondicionados es aproximadamente de 1 mg PSGL/mL de resina.

65 La cromatografía de intercambio aniónico fue realizada como sigue. Medios acondicionados de CHO microfiltrados fueron cargados en la columna con un pH aproximado de 7 y una conductividad inferior a 20 mS/cm. La columna fue objeto de lavado con histidina 20 mM, 400 mM NaCl, con pH 6,5 para extraer la rPSGL-Ig hiposulfatada v.g., 4 o menos sulfataciones. Las etapas de carga y de lavado fueron realizadas en 35 cm/minuto. La columna fue eluida a un pH de 6,5 con 1 M NaCl, 20 mM histidina, pH 6,5 en menos de 1,1 cm/minuto. El pH de esta etapa podría estar comprendido entre pH 4 y 8, pero es preferentemente pH 6,5. El pico eluido contiene PSGL-Ig, ADN e histonas así

ES 2 321 539 T3

como otros elementos de contaminación. La columna Q liga el ADN y las histonas están unidas al ADN. La elución de PSGL (causada elevando la concentración de sal) coincide con la elución de ADN. La pureza de PSGL-Ig es superior al 80%. Solamente un 50% del ADN se extrae en esta etapa.

- 5 Bajo estas condiciones, moléculas de rPSGL-Ig hipersulfatadas, v.g., cinco o seis sulfataciones, son preferentemente purificadas. La rPSGL-Ig activa tiene, en condiciones ideales, cinco o seis sulfataciones en las tirosinas de terminales N.

- 10 El eluyente procedente de la columna de intercambio aniónico fue purificado todavía más utilizando una columna de cromatografía de interacciones hidrofóbicas (HIC) como sigue.

- 15 Una columna Phenyl Toyopearl 650C (Rohm and Heas) con una profundidad de lecho de 9 cm fue preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La capacidad de la columna de HIC es aproximadamente 3,5 mg de PSGL/mL de resina. La columna fue equilibrada en 1,2 M de sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,1 a 1,3 cm/minuto. El eluyente procedente de la columna Q Sefarosa fue ajustado a 1,2 M sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,4 añadiendo 3 M sulfato amónico, 50 mM Tris, pH 7,4 y cargado en la cromatografía HIC. Como alternativa, la carga pudo realizarse en 4 M NaCl en lugar de 1,2 M sulfato amónico. La columna fue objeto de lavado con 1,2 M sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,4. Las etapas de carga y lavado se realizaron a una velocidad de aproximadamente 1,3 cm/minuto. La columna de HIC fue eluida con 0,48 M sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,4 a 0,65 cm/minuto. Bajo estas condiciones, la columna de HIC extrae primariamente histonas H2A H2B que no enlazan ADN tan estrechamente con las histonas H3 y H4. Histonas H2 aparecen en la fracción de lavado y el pico contiene histonas H3 y H4 y algunas histonas H2. Además, una gran pluralidad del ADN permanece en las histonas y se produce la elución en el pico. El producto es más del 95% puro de proteínas contaminantes y un 85% del ADN es extraído en esta etapa.

- 25 El eluyente desde la columna de HIC fue purificado todavía más utilizando una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC) como sigue.

- 30 Una columna de cobre IMAC (II) en Fractogel de quelatos (M) (E. Merck) fue preparada según las instrucciones del fabricante. La columna de IMAC tenía una profundidad de lecho de 6,47,2 cm y una capacidad de aproximadamente 6,6 mg PSGL-1/mL de resina.

- 35 La columna fue equilibrada con 50 mM fosfato potásico (KP04), 2,0 M NaCl, 2 mM imidazol, pH 7 para 5 cv a ≤ 5 cm/minuto. El eluyente procedente de la columna de HIC fue ajustado a 2 mM imidazol, 50 mM KP04, pH 7 200 mM NaCl y cargado en la columna de IMAC. La columna fue lavada primero con solución tampón de equilibrado y a continuación fue lavada con 40 mM Mes, 1 M NaCl, 5 mM imidazol, pH 6,6 a ≤ 5 cm/minuto. Esta baja concentración salina no descompone el complejo de ADN/histona en la columna de IMAC. La columna fue eluida con 40 mM MES, 1 M NaCl, 35 mM imidazol, pH 6,6. La columna de IMAC extrae primariamente histonas H3 y H4. Las histonas H3 y H4, y algunas histonas H2, están en la banda, aunque algunas histonas H3 y H2 se encuentran en el pico de IMAC. El producto resultante es más del 99,9% puro de proteínas contaminantes y en esta etapa se extrae un 95% del ADN. En total, existe aproximadamente 2,5 LRV de depuración de ADN a partir de este proceso completo.

- 45 Este proceso permitió el desplazamiento del ADN a través del tren del proceso completo, como el ADN ligado directamente en la columna Q. en la etapa Q, el ADN ligado también a histonas (v.g., H2A, H2B, H3 y H4) que son proteínas ligandos de ADN de presencia natural que existen en nuestra carga a la columna Q. Por lo tanto, en la columna Q había una disposición tipo "sandwich", en las que el ADN estaba ligado a la columna Q y las histonas estaban ligadas al ADN. En las etapas posteriores la disposición tipo "sandwich" fue invertida, puesto que el ADN no está ligado directamente a la columna HIC o la columna IMAC. En cambio, las histonas están ligadas a la columna de HIC o IMAC y el ADN está ligado a las histonas. Cuando las histonas son eluidas desde la columna de HIC o IMAC, transmiten con ellas la contaminación del ADN. Una extracción deficiente del ADN, debido a las interacciones de proteínas/ADN, se pueden encontrar con frecuencia en el procedimiento de purificación de proteínas, en particular, en el caso de proteínas objetivo altamente aniónicas y sobre todo donde estas proteínas aniónicas son eluidas desde una columna de intercambio aniónico.

- 55 Ejemplo 2

Purificación de proteína de fusión PSGL-Ig recombinante-proceso II (para fines ilustrativos solamente)

- 60 Este ejemplo describe la purificación de una proteína de fusión PSGL-Ig recombinante (rPSGL-Ig) mediante cromatografía de columnas, incluyendo la etapa de disociar los complejos de ADN/histonas contaminantes con sal o un alcohol aumentando, de este modo, la pureza de las proteínas PSGL-Ig.

- 65 Una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en Q Sepharose, fue realizada según se describe en el Ejemplo 1.

El eluyente procedente de la columna de intercambio aniónico fue purificada todavía más utilizando una columna de cromatografía de interacciones hidrofóbicas (HIC) como sigue. Una columna de Phenyl Toyopearl 650 C (Rohm and Heas), con una profundidad de lecho de 9 cm, fue preparada según las instrucciones del fabricante y equilibrada

ES 2 321 539 T3

en 1,2 M sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,4. EL pH de esta etapa podría estar comprendido entre 6 y 8, pero es preferentemente pH 7,4.

El pico de Q fue ajustado a 1,2 M sulfato amónico, 20 mM Tris y pH 7,4 añadiendo 3 M sulfato amónico, 50 mM Tris y pH 7,4 y cargado en la columna. Como alternativa, la carga podía realizarse en 4 M NaCl en lugar de 1,2 M sulfato amónico. La columna fue lavada con 1,2 M sulfato amónico, 20 mM Tris con pH 7,4, seguido por una operación de lavado con 4 M NaCl, 20 mM Tris, con pH 7,4. El lavado con 4 M NaCl extrae un 90% (o extracción de $1 \log_{10}$ o 1 LRV) del ADN desde la columna. Como alternativa, pudo efectuarse el lavado con isopropanol al 5% y 1,2 M sulfato amónico. De este modo, se extrae un 99,9% del ADN desde la columna (extracción de $3 \log_{10}$ o 3 LRV). Como alternativa, se pudo efectuar el lavado con etanol al 5% y 1,2 M sulfato amónico. De este modo, se extrae el 99,9% del ADN desde la columna (extracción de $3 \log_{10}$ o 3 LRV). Como alternativa, se pudo efectuar el lavado con etanol al 5% y 4 M NaCl. De este modo, se extrae un 99,9% del ADN desde la columna (extracción de $3 \log_{10}$ o 3 LRV). Como alternativa, se pudo efectuar el lavado con isopropanol al 5% y 4 M NaCl. De este modo, se extrae un 99,9% del ADN desde la columna (extracción de $3 \log_{10}$ o 3 LRV). Las etapas de carga y lavado se realizaron a una velocidad aproximada de 1,3 cm/minuto. A continuación, la columna fue eluida con 0,48 M sulfato amónico, 20 mM Tris, pH 7,4 a una velocidad de 0,65 cm/minuto.

Como se indicó anteriormente, esta cromatografía HIC, bajo estas condiciones, extrae primariamente histonas H2A y H2B, que no enlazan el ADN tan estrechamente como las histonas H3 y H4. Histonas H2 aparecen en el lavado. El pico contiene histonas H3 y H4 y algunas histonas H2. Sin embargo, hemos encontrado que lavando con más altas concentraciones de sal, se puede descomponer la interacción de ADN/histona. De este modo, lavando con, por ejemplo, 4 M NaCl en lugar de 1,2 M sulfato amónico, el ADN se descompone desde la histona y sale en el lavado. Bajo estas condiciones, una gran pluralidad del ADN aparece en el lavado y las histonas todavía son objeto de elución en el pico. La etapa de cromatografía HIC podría realizarse, de forma alternativa, después de la etapa de IMAC (véase a continuación). Esto podría dar lugar a un 99,9% de más ADN extraído (3 LRV).

El eluyente procedente de la columna de HIC fue purificado nuevamente utilizando una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC) como sigue.

Una columna de cobre IMAC (II) en Fractogel de quelatos (M) (E. Merck) fue preparada según las instrucciones del fabricante. La columna de IMAC tenía una profundidad de lecho de 6,4-7,2 cm y una capacidad de aproximadamente 6,6 mg PSGL/mL de resina. El pH de esta etapa puede estar comprendido entre 4,8 y 8, pero es preferentemente de pH 6,6.

La columna fue equilibrada con 50 mM fosfato potásico (KPO_4), 2,0 M NaCl, 2 mM imidazol, pH 7 para 5 cv a 5 cm/minuto. Como alternativa, la columna puede equilibrarse en 200 mM NaCl en lugar de 2 M NaCl. El eluyente procedente de la columna de HIC fue ajustado a 2 mM imidazol, 50 mM KPO_4 , pH 7, 200 mM NaCl y cargado en la columna de IMAC. La carga puede realizarse, de forma alternativa, a 200 mM NaCl en lugar de 2 M NaCl.

La columna fue lavada primero con solución tampón de equilibrado y a continuación, con 4 mM MES, 2 M NaCl, 5 mM imidazol, pH 6,6 a ≤ 5 cm/minuto. La columna fue eluida con 40 mM MES, 1 M NaCl, 35 mM imidazol con pH 6,6. La columna de IMAC extrae primariamente histonas H3 y H4. Estas histonas y algunas histonas H2, están en la banda. Algunas histonas H3 y H2 se encuentran también en el pico de IMAC.

Esta etapa extrae un 90% más de ADN que en la etapa del proceso 1 del Ejemplo 1 (1 LRV) utilizando la carga de alta concentración salina o el lavado de alta concentración salina. La novedad de esta etapa es la carga con 2 M NaCl o el lavado con 2 M NaCl para extraer el ADN desde el complejo de histonas/ADN. Las histonas están ligadas a la columna de IMAC y el ADN a las histonas. Puesto que el ADN se liga mejor al complejo de H3/H4 que al complejo de H3/H2 o simplemente el complejo de histonas H2 y sería conveniente retirar el complejo de H3/H4 lo antes posible en el proceso. De este modo, realizando la cromatografía HIC después de la IMAC ha de mostrarse que se puede conseguir más depuración del ADN (99,9% más o 3 LRV). Por lo tanto, incorporando la cromatografía IMAC lo antes posible en el proceso podría obtenerse una reducción todavía mayor del ADN. Sin embargo, la cromatografía IMAC, como en la primera etapa, exigiría una ultrafiltración/diafiltración para extraer los aminoácidos de peso molecular pequeño y otros grupos conteniendo aminos desde la carga.

Ejemplo 3

Purificación de proteína de fusión PSGL-Ig precombinante-proceso III (para fines ilustrativos solamente, excepto [0072] a [0079] IMAC)

Este ejemplo describe un procedimiento alternativo para la purificación de una proteína de fusión PSGL-Ig recombinante, v.g., rPSGL-Ig, mediante cromatografía de columnas. A diferencia del procedimiento de purificación descrito en el ejemplo 1, este proceso utiliza una etapa de afinidad como la primera etapa de purificación. La etapa de purificación de afinidad utiliza la rProteína A (también aquí referida como rPA), que liga el segmento Fc de la proteína quimera de rPSGL-Ig. La rPSGL-Ig es eluida desde la columna de rProteína A a bajo pH, en este caso, un pH de 3,7. La etapa rProteína A proporciona mejor depuración si la columna es lavada con 1 M NaCl después de la carga. Esta concentración de sal es más alta que la que se suele utilizar (aproximadamente 150 mM NaCl) y por consiguiente,

constituye una novedad. La depuración del ADN desde esta etapa lleva el valor de extracción de $4 \log_{10}$ (LRV) a 6 LRV con la adición de esta etapa de concentración salina. Esto representa un aumento de 100 veces en la extracción del ADN.

5 La etapa de rProteína A no parece que produzca el ligado de histonas y proporciona buena depuración del ADN. Por lo tanto, las histonas no están notoriamente presentes en las etapas siguientes a la etapa de rProteína A. Sin embargo, puesto que la rProteína A es objeto de lixiviación desde la columna de rProteína A, las posteriores etapas se realizan para la extracción de la rProteína A. Un nuevo procedimiento para la extracción de la proteína A lixiviada es cargar la proteína A eluida directamente en la columna Q, a un pH bajo o neutro o con lavado de la columna Q a
10 pH bajo. Las columnas Q no funcionan normalmente a pH bajo, en particular no con pH 4. De este modo, la captura de la rPSGL-Ig directamente desde el eluato de proteína A o el lavado de la columna Q a pH bajo o una combinación de ambos, constituye una novedad de la invención. Puesto que la rPSGL-Ig y la proteína A son de pH bajo, una gran pluralidad de la rPSGL-Ig no está ligada a la rProteína A lixiviada. Como resultado, la proteína A no es ligada a la columna Q, sino que se encuentra en el flujo pasante de Q. Esto constituye también una novedad. De este modo, se
15 está utilizando la columna Q para la extracción de la rProteína A. Este nuevo procedimiento se puede utilizar para purificar proteínas altamente aniónicas. Una columna de flujo rápido de proteínas A (Amersham Pharmacia) con una profundidad de lecho de 6 a 10 cm, se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La capacidad de la columna es de aproximadamente 1 mg/mL a 5 mg/mL. La columna es equilibrada con 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,2 a 8, preferentemente pH 7,4. Medios acondicionados microfiltrados se cargan en la columna entre pH 7 y pH
20 8, preferentemente pH 7,4 a una velocidad aproximada de 30-300 cm/hora, preferentemente 150 cm/hora. La columna es lavada con 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7 a 8, preferentemente pH 7,4 y eluida con 20 mM citrato, pH 3 a 4, preferentemente pH 3,7 a una velocidad de 50-300 cm/hora. La pureza es superior al 95% para las proteínas y más del 99% del ADN es eliminado en esta etapa.

25 El eluente procedente de la columna de rProteína A se purifica todavía más en la columna de flujo rápido Q Sepharose™ (Amersham Pharmacia) con una profundidad de lecho de 8 cm. La capacidad de la columna Q Sepharose para PSGL, a pH de 3,6 a 4,0, preferentemente pH 3,8, después de la etapa de rProteína A, es aproximadamente de más de 6 mg de PSGL/mL de resina.

30 El pico de rProteína A se carga directamente en la columna Q Sepharose sin ajustar el pH o el pico es neutralizado antes de la carga en la columna Q Sepharose. En uno u otro caso, la columna es lavada con 200 mM NaCl y 20 mM citrato a pH 3,5 o 4, preferentemente pH 3,8, para extraer la proteína A residual. Ambos procedimientos eliminan proteína A lixiviada, rPSGL-Ig y hiposulfatado, rPSGL-Ig con N-terminales y pro-rPSGL-Ig (una especie precursora para rPSGL-Ig que no tiene segmentación enzimática de N-terminales). después del lavado de pH 3,5 a 4, la columna
35 podía lavarse con 20 mM histidina, 400 mM NaCl, pH 6,5 para extraer rPSGL-Ig hiposulfatada, moléculas de rPSGL-Ig hiposulfatadas que tienen 4 o menos sulfataciones, mientras que la rPSGL-Ig activa, en condiciones ideales, tiene 5 o 6 sulfataciones en las tirosinas de terminales N. Las etapas de carga y lavado de la columna se realizan a una velocidad de 3,5 cm/minuto. La columna es eluida a pH 6,5 con 1 M NaCl, 20 mM histidina, pH 6,5. Como alternativa, se pudo eluir a un pH 3,5 a 4,0, preferentemente a un pH de 3,8 en 500 mM NaCl, 20 mM citrato a una velocidad inferior a
40 1,1 cm/minuto. Las proteínas representan menos del 2% del pico.

Como alternativa, la rProteína A lixiviada se puede extraer mediante la elevación del pH de disociación del complejo de proteína A/rPSG-Ig. Elevando el pH de disociación, el compuesto que contiene Fc, v.g., rPSGL-Ig se puede separar con mayor facilidad y extraerse de la proteína A mediante el uso de una columna cromatográfica, tal como,
45 por ejemplo, una columna Q, v.g., una columna de flujo rápido Q Sepharose (Amersham Pharmacia), una columna de cromatografía de interacciones hidrofóbicas (HIC), una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC), una hidroxí-apatita, columnas de intercambio aniónico o catiónico. El pH de disociación se puede elevar mediante el uso de arginina y/o cualquier otra composición que descomponga o impida que las interacciones hidrofóbicas eleven el pH de disociación, v.g., etileno glicol, propileno glicol, etanol, propanol, metanol y compuestos orgánicos similares.
50 Un más alto pH de disociación permite la extracción de rPA a un pH más normal que el que de otro modo produciría la disociación. El uso de un pH más alto, v.g., más alto de pH 3,7, también da lugar a menos daños, v.g., pérdida de sulfatación o sialación o segmentaciones de Asp-Pro, para alguna porción de Fc que contenga proteínas, v.g., rPSGL-Ig debido a un pH más bajo, v.g., pH 3,7.

55 Anteriormente, las columnas Q no podían utilizarse para disociación de rPA a partir de segmentos Fc que contienen proteínas (distinto de los segmentos Fc que contengan proteínas que sean altamente aniónicas) porque el pH era generalmente demasiado bajo para permitir el ligado de la molécula de Fc o la rProteína A a la columna Q. La elevación del pH de disociación mediante, por ejemplo, el uso de arginina y/o etileno glicol, siendo el pH de disociación suficientemente alto para permitir el uso de la columna Q para el segmento Fc que contenga moléculas bajo
60 condiciones de disociación, incluyendo las moléculas que no sean altamente aniónicas.

Además, anteriormente, las columnas de cromatografía IMAC no pudieron utilizarse bajo condiciones de disociación, v.g., pH bajo, de nuevo porque la molécula conteniendo Fc y la rPA no permanecerían ligadas a la columna de IMAC bajo el pH normalmente bajo necesario para que se produzca la disociación. Mediante la elevación del pH
65 de disociación mediante, por ejemplo, el uso de etileno glicol, la proteína que contiene el Fc permanece ligada a la columna de IMAC, de modo que se puede utilizar la columna de IMAC para la extracción de rProteína A.

ES 2 321 539 T3

Una columna de cromatografía HIC se puede utilizar también para la extracción de rPA desde moléculas que contengan Fc aún pH más normal que el de disociación que normalmente se produciría mediante la elevación del pH de disociación, por ejemplo, mediante el uso de arginina y/o etileno glicol.

5 *Disociación de rPA y rPSGL-Ig bajo condiciones de cromatografía IMAC*

El siguiente ejemplo describe la caracterización de condiciones adecuadas para la extracción de rProteína A desde rPSGL-Ig utilizando la columna de IMAC, la columna de HIC y la columna Q. Para desarrollar la etapa de extracción de rPA para la columna de cromatografía IMAC, que eliminará la rProteína A, mientras que la rPSGL-Ig es absorbida en la columna de IMAC, deben desarrollarse condiciones que no contengan ningún agente quelante, v.g., citrato o aminoácidos, v.g. arginina y debe tener una concentración salina relativamente alta para reducir al mínimo las interacciones iónicas con la superficie de la columna IMAC y la superficie de rPSGL-Ig. Se utilizó arginina, en este experimento, para descubrir la posible utilidad de la arginina con la columna Q o la columna HIC para la extracción de la proteína A.

Para poder caracterizar la disociación de rPSGL-Ig y rProteína A, fue preparada una columna de proteína A, según se describió anteriormente. La columna de rProteína A fue equilibrada con 20 mM Tris de pH 7,8, 200 mM de NaCl. La rPSGL-Ig fue cargada en la columna de rPA y se añadió 5 M NaCl para elevar la conductividad a 25-30 mS/cm y la columna fue titularizada con Tris HCL o tris base para pH 7,8. La columna fue lavada para 4 ev con una solución tampón de equilibrado. Las condiciones de elución ensayadas incluyen lo siguiente:

Elución 1: etileno glicol al 50% (EG), 200 mM de NaCl, 20 mM de acetato sódico con un pH aproximado de 5,7;

Elución 2: EG al 50%, 200 mM NaCl, 20 mM de acetato sódico con pH de 5,7 y 500 mM arginina;

Elución 3: EG al 50%, 1 M NaCl, 20 mM acetato sódico, pH aproximado de 5,0 y

Elución 4: EG al 50%, 1 M NaCl, 20 mM acetato sódico con un pH aproximado de 5,0 y 500 mM de arginina.

Todas las eluciones son de 5 cv a 2 ml/minuto. Una elución final fue realizada con 20 mM citrato y un pH aproximado de 2,7.

Los resultados demostraron que el complejo de rPSGL-Ig/proteína A se puede descomponer con la elución 2, v.g., con un pH aproximado de 5,7 y descompone con la elución 3, v.g., con un pH aproximado de 5,0. La columna de IMAC no pudo utilizarse con la elución 2 debido a la adición de arginina. Los resultados indicaron que 3 cv de elución 3 (EG al 50%, 1 M NaCl, 20 mM de acetato sódico con un pH aproximado de 5,0), cuando se aplicaba a una columna de IMAC, podría disociar el rPA a partir de la rPSGL-1 ligada y extraer una parte significativa de la rPA desde el tren del proceso de rPSGL-1.

Los resultados indican también que aproximadamente un 20% de la rPA se eliminaría de la rPSGL-Ig en un lavado de 2 cv con elución 2 (EG al 50%, 200 mM NaCl, 20 mM de acetato sódico, con un pH aproximado de 5,7 y 500 mM arginina) si PSGL-Ig estaba ligada a otra resina, v.g., una columna Q o una columna HIC. Una columna Q se puede utilizar para la extracción de la proteína A aumentando el pH de disociación con arginina y, por ejemplo, una composición o agente que descompone las interacciones hidrofóbicas, tal como, por ejemplo, etileno glicol (EG). Por ejemplo, la columna Q es objeto de lavado a un pH aproximado entre 5,0 y 5,7 con, por ejemplo, 200 mM NaCl, etileno glicol al 50% y 20 mM de acetato sódico y 500 mM de arginina. Una columna de HIC puede utilizarse también para la extracción de la proteína A con un aumento del pH de la disociación.

Un gradiente de pH con EG al 50%, 1 M NaCl en una columna de rProteína A con PSGL fue utilizado para determinar el pH máximo que se puede emplear por IMAC para la extracción de proteína A desde rPSGL-Ig. Una columna de rProteína A fue preparada según se describió anteriormente y fue ensayado un gradiente desde pH 5,7 a pH 5,0.

Los resultados indicaron que el agregado de rPSGL-Ig/rProteína A se puede separar casi completamente a un pH 5,3 con etileno glicol al 50% y 1 M NaCl con 20 mM de acetato sódico. El agregado de rPSGL-Ig/rProteína A se puede descomponer parcialmente a pH 5,0 con EG al 50% y 1 M NaCl, 20 mM de acetato sódico. La rPSGL-Ig se puede eluir desde la columna rPA a valores del pH de hasta 5,5 y se puede eluir relativamente bien a pH 5,3 en EG al 50% y como opción, 1 M NaCl, aunque la alta concentración de NaCl no es necesaria para la elución. NaCl a una concentración de 50-200 mM sería óptima.

La elución al más alto pH se compara favorablemente con la elución a pH 3,7, donde la rPSGL-Ig puede perder sulfatación, sialación y se pueden producir segmentaciones de Asp-Pro, que se aceleran a un pH bajo.

65 *Disociación de rPA y rPSGL-Ig bajo condiciones de HIC y condiciones de columnas.*

Para determinar las propiedades de disociación de rPSGL-Ig y rPA en condiciones de elución de HIC y condiciones de lavado de columna Q, un gradiente de pH desde pH 6 a pH 4 sobre 20 cv en 20 mM citrato, 500 mM arginina y 500

mM de sulfato amónico fue realizado para simular estrechamente las condiciones de elución de HIC. Las condiciones de elución de HIC son aproximadamente 0,5 M sulfato amónico.

Fue preparada una columna de rProteína A según fue anteriormente descrito. La columna fue equilibrada primero con 20 mM Tris pH 7,8, 200 mM NaCl. La columna fue cargada con rPSGL-Ig y titularizada con Tris HCL o tris base a pH 7,8 y lavada para 4 cv con solución tampón de equilibrado. El gradiente fue realizado desde 20 mM citrato, 500 mM arginina y 500 mM sulfato amónico pH 6 a 20 cv en 20 mM citrato, 500 mM arginina y 500 mM sulfato amónico con pH 4.

Los resultados indicaron que la asociación de rPA/rPSGL-Ig se puede descomponer, a aproximadamente pH 4,2, con 500 mM arginina, 0,5 M sulfato amónico y 20 mM citrato, a diferencia de un pH de aproximadamente 3,7 sin la arginina. Estos resultados indican que la arginina puede afectar, en gran medida, a las propiedades de disociación de rPSGL-Ig y rPA. La realización de una columna de HIC a aproximadamente pH 4,1 extrae la rPA desde la corriente del proceso, permitiendo la elución de rPSGL-Ig libre de rPA. La columna de HIC puede realizarse a un pH 4,1 con un lavado acv a pH 4,1 realizado inmediatamente antes, en 500 mM de arginina. Como alternativa, la elución de la columna de HIC a un pH 4,1 con 500 mM arginina, pero sin lavado antes de la arginina, puede reducir también la rPA.

Un gradiente de etileno glicol fue realizado desde 0% a 50% sobre 20 cv en 20 mM acetato, 500 mM arginina y 500 mM sulfato amónico. Los resultados indican que la mayor parte de la rPSGL-Ig es completamente disociada de la rPA en etileno glicol al 30%, pH 4,7 y 500 mM arginina.

Además, 2 LRV de rPA pueden ser afectados mediante la elución de la rPSGL-Ig en 500 mM arginina, 400 mM sulfato amónico, pH 4,1, después del lavado de la columna de HIC con 500 mM arginina, 1,2 M sulfato amónico y pH 4,1.

Otro experimento fue realizado para investigar si la adición de arginina y la elevación del pH cambia las condiciones de elución de rPSGL-Ig en la columna de HIC y resuelve mejor la rPSGL-Ig respecto a la rPA en la columna de HIC con una carga que contenga rPA.

Los resultados indicaron que 1,1 LRV de rPA fue afectado con condiciones de elución a pH 4,1, 0,9 LRV fue afectado con condiciones de elución a pH 4,3 y 0,7 LRV fue afectado con condiciones de elución a pH 4,5.

Una columna Q se puede utilizar también para separar el complejo de rProteína A/rPSGL-Ig mediante la adición de una composición o agente que actúa para separar las interacciones hidrofóbicas, v.g., etileno glicol, a una concentración suficiente para elevar el pH a un nivel que permita que las moléculas que contienen Fc ligado a la columna se puede utilizar para separar la rProteína A con una columna Q. Por ejemplo, un pH comprendido entre aproximadamente 5,5 y 5,7, preferentemente 5,5 se puede utilizar en esta operación.

Referencias citadas en la memoria descriptiva

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector solamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado en cumplir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la memoria descriptiva

- WO 0172769 A [0003] [0004] [0007] [0011] [0013]
- US 5429746A [0035]
- WO 9522389 A1 [0015]
- US 5115101 A [0035]
- US 5827817 A [0028] [0028] [0028] [0028] [0029] [0034]
- EP 06010184 A [0081] [0082]
- US 60296402 B [0081] [0082]

Bibliografía no de patente citada en la descripción

Purificación de proteínas: Principios, métodos de alta resolución y aplicaciones. *VCH Publishers, Inc.*, 1989 [0035].

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para disociar moléculas que contengan un Fc a partir de complejos de proteína A/moléculas que contienen un Fc en una mezcla, comprendiendo poner en contacto la mezcla con una columna de cromatografía de quelatos metálicos (IMAC), en condiciones de pH comprendido entre 5,0 y 5,7, en el cual las condiciones de disociación se establecen mediante la adición de etileno glicol a dicha mezcla para disociar las moléculas que contienen un Fc a partir de los complejos de proteína A/moléculas que contienen un Fc.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se utiliza una solución tampón que contiene un 50% de etileno glicol.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende, además, eluir las moléculas que contienen un Fc a partir de la columna de cromatografía de quelatos metálicos, de tal modo que dichas moléculas que contienen un Fc estén sustancialmente exentas de proteína A.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que las condiciones del pH se encuentran en 5,0.

20 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha columna IMAC es lavada con una solución tampón que contiene un 50% de etileno glicol, 1 M de NaCl de 20 mM de acetato sódico, con un pH de 5,0, disociando así los complejos de proteína A/moléculas que contienen un Fc.

25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula que contiene Fc es rPSGL-Ig.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 321 539 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Coffman, J.L. *et al*

<120> Procedimientos para purificar proteínas altamente aniónicas

<130> P29102/EP/T1

<140> EP06010184.7

<141> 2002-06-05

<150> US60/296.402

<151> 2001-06-05

<160> 1

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn

1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu

20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr

35 40 45

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg

50 55 60

Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser

65 70 75 80

Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly

85 90 95

Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu

100 105 110

Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala

115 120 125

Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr

130 135 140

ES 2 321 539 T3

Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu
 145 150 155 160
 5 Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro
 165 170 175
 10 Thr Gly Leu Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln
 180 185 190
 Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala
 15 195 200 205
 Met Glu Ala Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
 20 210 215 220
 Ala Pro Glu Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu
 225 230 235 240
 25 Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro
 245 250 255
 Ser Ala Thr Glu Ala Leu Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu
 30 260 265 270
 Phe Ile Pro Phe Ser Val Ser Ser Val Thr Gis Lys Gly Ile Pro Met
 35 275 280 285
 Ala Ala Ser Asn Leu Ser Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His
 290 295 300
 40 Ile Ser Val Lys Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val
 305 310 315 320
 45 Ala Thr Ile Phe Phe Val Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser
 325 330 335
 Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met
 50 340 345 350
 Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala
 355 360 365
 55 Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro
 370 375 380
 60 Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe
 385 390 395 400
 65 Leu Pro

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Coffman, J.L. *et al*

5 <120> Procedimientos para purificar proteínas altamente aniónicas

<130> P29102/EP/T1

<140> EP06010184.7

<141> 2002-06-05

10 <150> US60/296.402

<151> 2001-06-05

<160> 1

15 <170> Patente en versión 3.3

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

20 <213> *Homo Sapiens*

<400> 1

25 Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
 30 20 25 30
 Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
 35 35 40 45
 Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
 50 55 60
 40 Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
 65 70 75 80
 Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
 45 85 90 95
 Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
 50 100 105 110
 Ser Thr Asp Ser Ala ALa Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
 115 120 125
 55 Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr
 130 135 140
 Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu
 60 145 150 155 160
 Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro
 65 165 170 175

ES 2 321 539 T3

	Thr Gly Leu Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln
	180 185 190
5	Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala
	195 200 205
10	Met Glu Ala Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
	210 215 220
	Ala Pro Glu Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu
15	225 230 235 240
	Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro
	245 250 255
20	Ser Ala Thr Glu Ala Leu Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu
	260 265 270
25	Phe Ile Pro Phe Ser Val Ser Ser Val Thr Gis Lys Gly Ile Pro Met
	275 280 285
	Ala Ala Ser Asn Leu Ser Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His
30	290 295 300
	Ile Ser Val Lys Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val
35	305 310 315 320
	Ala Thr Ile Phe Phe Val Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser
	325 330 335
40	Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met
	340 345 350
45	Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala
	355 360 365
	Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro
50	370 375 380
	Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe
55	385 390 395 400
	Leu Pro