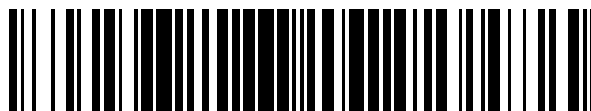


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 125**

51 Int. Cl.:
C07K 1/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778787 .4**

96 Fecha de presentación: **21.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1711512**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Procedimiento de purificación de proteínas**

30 Prioridad:
30.01.2004 US 540587 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**AMGEN INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320, US**

72 Inventor/es:
**SENCZUK, Anna y
KLINKE, Ralph**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 377 125 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de proteínas

Campo de la invención

Esta invención se refiere a la purificación de proteínas, y especialmente a un procedimiento de purificación de proteínas usando cromatografía de interacciones hidrófobas.

Antecedentes de la invención

La purificación de proteínas para la producción de productos biológicos o farmacéuticos a partir de diversos materiales de origen implica varios procedimientos. Las proteínas terapéuticas pueden obtenerse a partir de extractos plasmáticos o tisulares, por ejemplo, o pueden producirse mediante cultivos celulares o usando células eucariotas o procariotas que contienen al menos un plásmido recombinante que codifica para la proteína deseada. Entonces las proteínas modificadas genéticamente son, bien secretadas en el medio circundante o en el espacio perinuclear, o bien creadas intracelularmente y extraídas de las células. Se utilizan varias tecnologías bien conocidas para purificar las proteínas deseadas a partir de su material de origen. Los procedimientos de purificación incluyen procedimientos en los que la proteína de interés se separa de los materiales de origen sobre la base de la solubilidad, la carga iónica, el tamaño molecular, las propiedades de adsorción y la unión específica a otras moléculas. Los procedimientos incluyen cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía de interacciones hidrófobas.

La cromatografía de interacciones hidrófobas (CIH) se usa para separar proteínas sobre la base de interacciones hidrófobas entre las fracciones hidrófobas de la proteína y grupos hidrófobos insolubles inmovilizados en la matriz. Generalmente, la preparación proteica en un tampón altamente salino se carga en la columna de CIH. La sal del tampón interactúa con las moléculas de agua para reducir la solvatación de las proteínas en disolución, exponiendo así las regiones hidrófobas de la proteína, que entonces son adsorbidas por grupos hidrófobos de la matriz. Cuanto más hidrófoba es la molécula, menor es la sal requerida para promover la unión. Habitualmente se usa un gradiente salino decreciente para eluir las proteínas desde una columna. Según disminuye la fuerza iónica, la exposición de las regiones hidrófilas de la proteína aumenta, y las proteínas se diluyen desde la columna en creciente orden de hidrofobicidad. Véase, por ejemplo Protein Purification, 2ª Ed., Springer- Verlag, Nueva York, 176-179 (1988). El documento US 5.231.171 (Holtz y col.) describe la purificación de la proteína IGF-1, mediante el uso de una columna cromatográfica de interacciones hidrófobas, el documento US 5.928.915 (Sliwkowski y col.) describe el uso de sulfato amónico 2 M en combinación con un tampón de fosfato en una columna cromatográfica de interacciones hidrófobas para purificar la proteína sialidasa de células CHO, y el documento US 5.395.856 (Haase) describe una columna de afinidad de avidina.

Cuando se desarrollan procedimientos para la producción comercial de proteínas terapéuticamente importantes, es altamente deseable aumentar la eficacia de cualquier etapa de purificación intermedia. Una forma de mejorar la facilidad y la eficacia de elaboración es aumentar la capacidad de carga de una o más de las etapas intermedias del procedimiento de purificación, hasta el punto de reducir el número de ciclos requeridos para purificar un lote de proteínas sin comprometer la calidad de la separación de las proteínas. La presente invención mejora el procedimiento de purificación de proteínas aumentando la capacidad y la eficacia de una etapa intermedia.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para purificar una proteína que comprende mezclar una preparación proteica con una disolución que contiene una primera sal y una segunda sal, formando una mezcla que se carga en una columna cromatográfica de interacciones hidrófobas, y eluyendo la columna, en el que la primera y la segunda sales tienen diferentes valores liótopos, y al menos una sal tiene capacidad tamponante a un pH al cual es estable la proteína, en el que la concentración de cada una de la primera sal y la segunda sal en la mezcla está entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1,0 M, y en el que la primera y la segunda sal se eligen de los grupos formados por citrato y sulfato, citrato y acetato, citrato y fosfato, acetato y sulfato, y sulfato y fosfato. En una forma de realización, el pH de la mezcla y el tampón de equilibrio está entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7. El procedimiento comprende adicionalmente eluir la proteína.

La presente invención proporciona combinaciones de sales útiles para aumentar la capacidad dinámica de una columna de CIH en comparación con la capacidad dinámica de la columna usando sales separadas solas. Estas combinaciones de sales permiten disminuir la concentración de al menos una de las sales para conseguir una mayor capacidad dinámica, sin comprometer la calidad de la separación de las proteínas. La primera y la segunda combinación de sales se eligen para cada proteína en particular mediante un procedimiento que establece las curvas de precipitación para cada sal individualmente, y las curvas de precipitación para la combinación de sales manteniendo una sal constante y variando la segunda. Las concentraciones de las combinaciones salinas pueden optimizarse adicionalmente, por ejemplo, para asegurar la estabilidad proteica a la temperatura ambiente y para evitar la formación de agregados en la preparación.

Las primeras sales preferidas son aquellas que forman tampones eficaces a un pH al cual es estable la proteína. La

primera y la segunda sal se eligen entre acetato, citrato, fosfato, sulfato o cualquier sal mineral o de un ácido orgánico de las mismas. En una forma de realización, el pH de la mezcla está entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7. Las concentraciones salinas finales de la primera sal y de la segunda sal en la mezcla están cada una entre aproximadamente 0,1 M y 1,0 M, en otra forma de realización entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,7 M. Los cationes pueden elegirse de entre cualquier catión no tóxico, incluyendo NH_4^+ , K^+ y Na^+ . Los cationes preferidos son aquellos que no tienden a desnaturar la proteína o a provocar la precipitación en combinación con otros iones, incluyendo NH_4^+ y Na^+ .

La columna puede eluirse con una disolución con un pH de entre aproximadamente pH5 y aproximadamente pH7. Las sales pueden elegirse de entre sales de sodio, de amonio y de potasio, y son preferiblemente sales sódicas. La proteína puede ser una proteína de fusión o un anticuerpo, tal como una proteína de fusión Fc o un anticuerpo monoclonal. El procedimiento puede incluir diluir la proteína, filtrar la proteína, formular la proteína y/o liofilizar la proteína.

Los dos tampones salinos de la presente invención dan como resultado un aumento en la capacidad dinámica de una columna de CIH para una proteína en particular en comparación con la capacidad dinámica conseguida por sales individuales. Esto da como resultado una disminución del número de ciclos requerido para purificar un lote de proteínas. Por lo tanto, la presente invención tiene una aplicabilidad especial en las prácticas de elaboración comerciales para elaborar y purificar proteínas comercialmente importantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra curvas de precipitación salina dobles para un anticuerpo frente al EGFR realizadas según se describe en el Ejemplo I, a continuación. La Figura 1A muestra la curva de precipitación para sulfato sódico 0,5 M con concentraciones crecientes de fosfato sódico, y la curva de precipitación para fosfato sódico 0,4 M con concentraciones crecientes de sulfato sódico. La Figura 1B muestra las curvas de precipitación para citrato sódico 0,55 M con concentraciones crecientes de fosfato sódico, y fosfato sódico 0,4 M con concentraciones crecientes de citrato sódico. La Figura 1C muestra las curvas de precipitación para acetato sódico 0,6 M con concentraciones crecientes de sulfato sódico, y fosfato sódico 0,5 M con concentraciones crecientes de sulfato sódico. La Figura 1D muestra las curvas de precipitación para acetato sódico 0,6 M con concentraciones crecientes de citrato sódico, y citrato sódico 0,55 M con concentraciones crecientes de acetato sódico. La Figura 1E muestra las curvas de precipitación para citrato sódico 0,55 M con concentraciones crecientes de sulfato sódico, y sulfato sódico 0,5 M con concentraciones crecientes de citrato sódico.

Descripción detallada de la invención

La cromatografía de interacciones hidrófobas (CIH) se usa ahora ampliamente como una importante herramienta de bioseparación en la purificación de muchos tipos de proteínas. El procedimiento se basa en la separación de proteínas sobre la base de las interacciones hidrófobas entre regiones no polares de la superficie de las proteínas y grupos hidrófobos insolubles inmovilizados en la matriz. La absorción aumenta con una alta concentración salina en la fase móvil, y la dilución se consigue disminuyendo la concentración salina del eluyente (Fausnaugh y col., J Chromatogr 359, 131-146 (1986)). Una preparación proteica en cualquier etapa de purificación se "condiciona" en la preparación para CIH mezclándola con tampones altamente salinos para preparar la "carga" de la CIH que se va a cargar en la columna. Generalmente, se han considerado útiles los requisitos de sulfato amónico entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 2 M, y una concentración salina de NaCl de entre aproximadamente 1,0 y 4,0 M, para la purificación de proteínas usando columnas de CIH. La práctica fue añadir una elevada concentración de una sal para disminuir la concentración de la disolución tampón, tal como, por ejemplo, NH_4SO_4 1,4 M añadido a tampón de fosfato 0,024 M para la purificación de anticuerpos monoclonales a pH 7,2 (Nau y col., BioChromatography 62 (5), 62-74 (1990)); o sulfato amónico 1,7 M en NaPO_4 50 mM para purificar proteínas de la superficie de células de levadura (Singleton y col., J. Bacteriology 183 (12) 3582-3588 (2001)). La presente invención difiere de estas prácticas en el uso de una concentración intermedia de una sal tamponante en combinación con una concentración intermedia de una segunda sal tamponante, o en combinación con una concentración intermedia de una segunda sal no tamponante, para conseguir un incremento en la capacidad dinámica.

También se ha reconocido que aumentando las concentraciones salinas se puede aumentar la "capacidad dinámica" de una columna, o la cantidad de proteína que puede cargarse en una columna sin "saturación" o pérdida de proteína a la fase de disolución antes de la elución. Al mismo tiempo, una elevada salinidad puede ser perjudicial para la estabilidad proteica. La elevada salinidad aumenta la viscosidad de una disolución, dando como resultado un aumento en la formación de agregados, que da como resultado una pérdida proteica debido a la dilución y la filtración de la proteína tras la elución desde la columna, y puede dar lugar a una reducción en la pureza (Queiroz y col., J. Biotechnology 87: 143-159 (2001), Sofer y col., Process Chromatography, Academic Press (1999)). La presente invención proporciona, sin embargo, un procedimiento para purificar proteínas que incrementa la capacidad dinámica de una columna de CIH para una proteína en particular reduciendo la concentración de sales usada, sin reducir la calidad de la separación proteica ni suscitar cuestiones de elaboración.

Según se usa en el presente documento, la expresión "columna de interacciones hidrófobas (CIH)" se refiere a una

columna que contiene una fase estacionaria o resina, y una fase móvil o disolución, en la que la interacción hidrófoba entre una proteína y los grupos hidrófobos de la matriz sirve de base para separar proteínas de impurezas, incluyendo fragmentos y agregados de la proteína en cuestión, otras proteínas o fragmentos de proteínas y otros contaminantes tales como desechos celulares o impurezas residuales procedentes de otras etapas de purificación.

5 La fase estacionaria comprende una matriz o soporte de base tal como agarosa reticulada, sílice o un material copolimérico sintético al que se unen ligandos hidrófobos.

Según se usa en el presente documento, la expresión "capacidad dinámica" de una columna de separación tal como una columna de interacciones hidrófobas, se refiere a la cantidad máxima de proteína en disolución que puede cargarse en una columna sin saturar significativamente o perder proteína en la fase de disolución de una columna antes de la elución. Más formalmente, $K' = (V_r - V_o)/V_o$ donde V_r es el volumen del soluto retenido y V_o es el volumen de soluto no retardado. De forma práctica, la capacidad dinámica de una columna de CIH dada se determinó midiendo la cantidad de proteína cargada en la columna, y determinando la carga de resina, que es mg de proteína/volumen de la columna (mg/ml-r). La cantidad de proteína que sale de la columna en la fase de disolución después de que la columna sea cargada ("saturación") pero antes de que comience la elución puede medirse entonces recogiendo las fracciones durante el procedimiento de carga y lavando en primer lugar con tampón de equilibrio. La carga a la cual no se produce una saturación significativa es la capacidad dinámica de la proteína para esas condiciones.

Según se usa en el presente documento, el término "tampón" o "disolución tamponada" se refiere a disoluciones que resisten cambios en el pH mediante la acción de su intervalo del conjugado ácido-base. Algunos ejemplos de tampones que controlan el pH a unos intervalos de aproximadamente pH 5 hasta aproximadamente pH 7 incluyen citrato, fosfato y acetato, y otros tampones de ácidos minerales o de ácidos orgánicos, y combinaciones de estos. Los cationes salinos incluyen sodio, amonio y potasio. Según se usa en el presente documento, el término "tampón de carga" o "tampón de equilibrio" se refiere al tampón que contiene la sal o las sales que se mezclan con la preparación proteica para cargar la preparación proteica en la columna de CIH. Este tampón también se usa para equilibrar la columna antes de la carga, y para lavar la columna después de cargar la proteína. El "tampón de elución" se refiere al tampón usado para eluir la proteína desde la columna. Según se usa en el presente documento, el término "disolución" se refiere tanto a una disolución tamponada como no tamponada, incluyendo agua.

Según se usa en el presente documento, el término "liotrópico" se refiere a la influencia de las diferentes sales sobre las interacciones hidrófobas, más específicamente al grado con que un anión incrementa el efecto de precipitación salina sobre las proteínas, o para cationes, incrementa el efecto de solubilización salina sobre las proteínas, según la serie de Hofmeister para la precipitación de proteínas a partir de disoluciones acuosas (Queiroz y col., J. Biotechnology 87: 143-159 (2001), Palman y col., J. Chromatography 131, 99-108 (1977), Roe y col., Protein Purification Methods: A Practical Approach. IRL Press Oxford, págs. 221-232 (1989)). La serie para aniones en orden de creciente de efecto de precipitación salina es: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, mientras que la serie para cationes en orden creciente de efecto de solubilización es: $\text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ (Queiroz y col., *supra*). Según la presente invención, combinando dos sales diferentes con diferentes valores liotrópicos con una preparación proteica permite cargar más proteína en una columna con poca o ninguna saturación en comparación con mayores concentraciones salinas de cada sal individual.

Es un objetivo de la presente invención producir condiciones para proteínas en particular que maximicen la cantidad de proteína que puede cargarse y retenerse en una columna de CIH con poca o ninguna reducción en la calidad de la separación de las proteínas. La presente invención es un procedimiento para purificar una proteína que comprende mezclar una preparación proteica con una disolución salina tamponada que contiene una primera sal y una segunda sal, en el que cada sal tiene un valor liotrópico diferente, y cargar la mezcla de proteína y sales en una columna de CIH y eluir la columna, en el que al menos una sal tiene una capacidad tamponante a un pH al cual la proteína se establece, y en el que la concentración de cada una de la primera sal y la segunda sal en la mezcla es de entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1,0 M, y en el que la primera y la segunda sales se eligen de los grupos consistentes en citrato y sulfato, citrato y acetato, citrato y fosfato, acetato y sulfato, y sulfato y fosfato.

Ahora se entiende que hay varios factores que influyen en las interacciones hidrófobas y que controlan la retención de la proteína natural en los grupos hidrófobos unidos a la matriz. Estos incluyen fuerzas de van der Waals, o interacciones electrostáticas entre dipolos inducidos o permanentes; puentes de hidrógeno, o interacciones electrostáticas entre grupos donantes ácidos y aceptores básicos; la hidrofobicidad de la propia proteína; y la influencia de varias sales sobre las interacciones hidrófobas. (Queiroz y col., J. Biotechnology 87: 143-159 (2001)). La serie de Hofmeister ("liotrópica") es una ordenación de aniones y cationes en términos de su capacidad para precipitar proteínas a partir de disoluciones acuosas, según se describió anteriormente. La serie para aniones es en orden decreciente de efecto de precipitación salina es: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, mientras que la serie para cationes en orden creciente de efecto de solubilización es: $\text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ (Queiroz y col., *supra*).

Los iones del inicio de las series promueven las interacciones hidrófobas y los efectos de precipitación o de precipitación salina, y se denominan anticaotrópicos (Queiroz y col., *supra*). Se considera que estructuran el agua, mientras que los iones del final de las series son iones de solubilización salina o caotrópicos, y aleatorizan la

estructura del agua y tienden a disminuir la fuerza de las interacciones hidrófobas, y dan como resultado una desnaturalización (Porath y col., *Biotechnol Prog* 3: 14-21 (1987)). La tendencia a promover las interacciones hidrófobas es la misma tendencia que promueve la precipitación de proteínas, y determina por tanto la concentración salina que provoca que una proteína en particular comience a precipitar, es un medio para determinar una concentración apropiada de esa sal para usar en una columna de CIH.

Según la presente invención, se eligen una primera sal y una segunda sal que tengan diferentes valores liotrópicos. Esta combinación de sales actúa conjuntamente para aumentar la capacidad dinámica de la columna de CIH para una proteína en particular. Se ha averiguado, según la presente invención, que cada sal en combinación puede proporcionarse a una concentración menor que la concentración de la sal individual para conseguir una mayor capacidad dinámica para una proteína en comparación con la capacidad dinámica usando una única sal. Según la presente invención, al menos una sal tiene una capacidad tamponante al pH deseado.

Según la presente invención, se determinan las concentraciones apropiadas de las sales para una proteína en particular generando curvas de precipitación para sales individuales, y después para sales combinadas. Sobre la base de las curvas de precipitación salina individuales, se generan curvas de precipitación para combinaciones de sales manteniendo una concentración salina constante y variando la concentración de la segunda sal. Entonces se mantiene constante la concentración de la segunda sal y se varía la concentración de la primera sal. A partir de estas dos curvas de precipitación salina, pueden determinarse las concentraciones de sales útiles para incrementar la capacidad dinámica de una columna de CIH. Esto se demuestra en los Ejemplos 1 y 2, a continuación, en los que las concentraciones de las dos combinaciones salinas se determinan usando curvas de precipitación para cada proteína en particular. Además, las concentraciones salinas pueden optimizarse con objeto de conseguir una estabilidad adicional sobre una proteína a temperatura ambiente, por ejemplo, o para limitar la formación de agregados. Por lo tanto, la presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para maximizar la capacidad dinámica de una columna de interacciones hidrófobas para una proteína en particular seleccionando una combinación de concentraciones para una primera y una segunda sal con diferentes valores liotrópicos, generando una serie de curvas de precipitación para las sales individuales, y después una combinación manteniendo cada una de las sales constante y variando la segunda.

Las sales de la presente invención se eligen de entre aquellas con una suficiente capacidad tamponante al pH al cual la proteína que se va a purificar es estable. En una forma de realización, las combinaciones salinas se eligen con una capacidad tamponante a entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente 7. Estas incluyen, por ejemplo, citrato, fosfato y acetato, y otros tampones de ácidos minerales o de ácidos orgánicos, y combinaciones de estos. Una segunda sal se elige de entre una sal que puede tamponar o no al pH deseado, y puede añadirse a la disolución tamponada, tal como sulfato amónico o sódico. Los cationes se eligen de entre aquellos que son no tóxicos y no desnaturalizantes. Los cationes preferidos según la presente invención son sodio, potasio y amonio, siendo el sodio el más preferido para propósitos de elaboración. Las sales preferidas para purificar proteínas según la presente invención incluyen combinaciones de citrato sódico, fosfato sódico, acetato sódico y sulfato sódico.

La concentración de las sales usadas según la presente invención dependerá de las características de las sales en particular. Las sales se usan a unas concentraciones de desde aproximadamente 0,1 M hasta aproximadamente 1,0 M en la concentración final de la mezcla de la preparación de la disolución salina y proteica, dependiendo de la sal y de la proteína, en otra forma de realización está en el intervalo de entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,7 M. El pH de la disolución tamponada puede variar dependiendo de los requisitos de la separación de proteínas. En una forma de realización, el pH varía entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7.

Columna de interacciones hidrófobas

La presente invención puede usarse con cualquier tipo de fase estacionaria de CIH. Las fases estacionarias varían en términos de ligando, longitud de la cadena del ligando, densidad del ligando y tipo de matriz o soporte. Los ligandos usados para la CIH incluyen alcanos de cadena lineal con y sin un grupo amino, grupos aromáticos tales como ligandos fenilo y N-alcano, incluyendo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo (Queiroz y col., *supra*). Comercialmente hay disponibles muchos tipos de columnas de CIH. Estas incluyen, pero no se limitan a, columnas de SEPHAROSE™ tales como Phenyl SEPHAROSE™ (Pharmacia LCK Biotechnology, AB, Suecia), columna FAST FLOW™ con una sustitución baja o alta (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de alto rendimiento Octilo SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columnas FRACTOGEL™ EMD Propilo o FRACTOGEL™, EMD Fenilo (E. Merck, Alemania); soportes MACROPREP™ Metilo o MACROPREP™ t-Butilo (Bio-Rad, California); columna WP HI-Propilo (C₃)™ (J. T. Baker, Nueva Jersey); y columnas TOYOPEARL™ éter, fenilo o butilo (TosoHaas, Pa.).

En una forma de realización se han usado columnas TOYOPEARL™ BUTILO-M para purificar proteínas según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La fase móvil de la CIH según la presente invención es la disolución salina doble. Los procedimientos de las aplicaciones comerciales para purificar grandes cantidades de proteínas requieren que las concentraciones exactas de las dos disoluciones salinas sean constantes y coherentes. Por lo tanto, el ajuste de la disolución salina disuelta se realiza con la forma ácida de la sal, tal como ácido cítrico mezclado con citrato para conseguir una concentración

iónica exacta. Las sales de la presente invención están todas disponibles comercialmente en varios proveedores. Al menos una sal de la disolución salina doble tendrá un efecto tamponante al pH al cual la proteína que se va a purificar es estable. En una forma de realización, la capacidad tamponante de al menos una sal está entre pH 5 y aproximadamente pH 7 según la presente invención.

5 El protocolo para usar una columna de CIH según la presente invención es generalmente como sigue. Primero la columna se regenera con varios volúmenes de columna de hidróxido sódico, NaOH 0,5 N, por ejemplo, después se lava con agua. Entonces la columna se equilibra con varios volúmenes de columna de tampón de equilibrado, que es el mismo tampón que contiene la preparación proteica para cargar en la columna. La preparación proteica se prepara "acondicionándola" o mezclándola con la disolución salina doble tamponada. Generalmente la disolución salina se añade lentamente con la preparación proteica a una tasa de aproximadamente el 1-2% en volumen por minuto, para evitar la desestabilización proteica. A continuación se carga en la columna la mezcla de la disolución salina proteica/tamponada, y la columna se lava con varios volúmenes de columna de tampón de equilibrio. Entonces la columna de CIH se eluye. La elución puede realizarse preferiblemente disminuyendo la concentración salina del tampón usando un gradiente salino o una elución isocrática. El gradiente o la etapa comienza a una concentración salina de tampón en equilibrio, y después se reduce como un gradiente continuo, o como pequeñas etapas de concentraciones sucesivamente menores. La elución concluye generalmente con el lavado de la columna con una disolución tal como un tampón sin sal, tal como un tampón MES de baja fuerza iónica, por ejemplo. La elución de la proteína en cuestión también puede realizarse cambiando la polaridad del disolvente, y añadiendo detergentes al tampón. Cuando se purifica la proteína, puede, diafiltrarse o diluirse para eliminar cualquier exceso de sales remanente.

El procedimiento para purificar una proteína según la presente invención se aplica a preparaciones proteicas en cualquier etapa de purificación. La purificación proteica de proteínas producidas recombinantemente incluye típicamente filtración y/o centrifugación diferencial para eliminar los desechos celulares y los fragmentos subcelulares, seguido de una separación usando una combinación de diferentes técnicas cromatográficas.

25 Puede cargarse un amplio intervalo de concentraciones de proteína en una columna de CIH usando el sistema de sales dobles de la presente invención. La preparación proteica que puede purificarse según la presente invención puede tener cualquier concentración, sin embargo preferiblemente puede variar entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml o más, más preferiblemente entre aproximadamente 2,5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml en una disolución acuosa. Según se usa en el presente documento, el término "proteína" se usa de forma intercambiable con el término "polipéptido" y se considera que es cualquier cadena de al menos diez aminoácidos o más unidos por enlaces peptídicos. Según se usa en el presente documento, el término "preparación proteica" se refiere a una proteína en cualquier etapa de purificación en una disolución acuosa. La concentración de la preparación proteica en cualquier etapa de purificación puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado. Dichos procedimientos son bien conocidos en la materia, e incluyen: 1) métodos colorimétricos tales como el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford y el ensayo de oro coloidal; 2) métodos que utilizan las propiedades de absorción UV de las proteínas; y 3) una estimación visual basada en bandas proteicas teñidas en geles que se basan en la comparación con proteínas estándar de cantidad conocida en el mismo gel, tal como una tinción con plata. Véase, por ejemplo, Stoschek Methods in Enzymol.182: 50-68 (1990).

40 Para el propósito de la presente invención, una proteína es "sustancialmente similar" a otra proteína si son idénticas en al menos el 80%, preferible en al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 95% entre sí en la secuencia de aminoácidos, y mantienen o alteran la actividad biológica de la proteína no alterada. Las sustituciones de aminoácidos que sean sustituciones conservativas, poco probable que afecten a la actividad biológica, se consideran idénticas para el propósito de esta invención, e incluyen las siguientes: Ala por Ser, Val por Ile, Asp por Glu, Thr por Ser, Ala por Gly, Ala por Thr, Ser por Asn, Ala por Val, Ser por Gly, Tyr por Phe, Ala por Pro, Lys por Arg, Asp por Asn, Leu por Ile, Leu por Val, Ala por Glu, Asp por Gly, y las inversas. (Véase, por ejemplo, Neurath y col., The Proteins, Academic Press, Nueva York (1979)).

50 El procedimiento para purificar proteínas según la presente invención está dirigido a todos los tipos de proteínas. La presente invención es particularmente adecuada para purificar fármacos basados en proteínas, también conocidos como biológicos. Típicamente, los biológicos se producen recombinantemente, usando sistemas de expresión procariotas o eucariotas tales como células de mamíferos o de levaduras, por ejemplo. La producción recombinante se refiere a la producción de la proteína deseada mediante cultivos de células hospedadoras transformadas que contienen un vector capaz de expresar la proteína deseada. Los métodos y los vectores para crear células o líneas celulares capaces de expresar proteínas recombinantes se describen, por ejemplo, en Ausabel y col, eds. Current Protocols in Molecular Biology, (Wiley & Sons, Nueva York, 1988, y actualizaciones trimestrales).

55 El procedimiento para purificar proteínas según la presente invención es particularmente aplicable a anticuerpos. Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos, incluyendo anticuerpos policlonales (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988)), y anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº RE 32,011, 4.902.614. 4.543.439. y 4.411.993, y Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum Press, Kennett, McKeam y Bechtol (eds.) (1980)). Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere también a un fragmento de un anticuerpo tal como F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, Fc, y a anticuerpos

monocatenarios que son producidos mediante técnicas de ADN recombinante o mediante la escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. El término "anticuerpo" se refiere también a anticuerpos biespecíficos o bifuncionales, que son un anticuerpo híbrido artificial con dos pares diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante varios procedimientos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. (Véase Songsivilai y col., Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny y col., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)). Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere también a anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos con un dominio constante de un anticuerpo de inmunoglobulina humano acoplado a uno o más dominios variables de anticuerpo de inmunoglobulina no humano, o fragmentos de los mismos (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.595.898 y la patente de EE.UU. Nº 5.693.493). Anticuerpos también se refiere a anticuerpos "humanizados" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567 y el documento WO 94/10332), a minianticuerpos (WO 94/09817), y a anticuerpos producidos por animales transgénicos, en los que un animal transgénico que contiene una proporción de los genes productores de un anticuerpo humano pero que carece de la producción de anticuerpos endógenos, son capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Mendez y col., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), y la patente de EE.UU. Nº 6.300.129). El término "anticuerpos" también incluye anticuerpos multiméricos, o proteínas de un orden de complejidad mayor tales como anticuerpos heterodiméricos. "Anticuerpos" también incluye anticuerpos anti-idiotípicos que incluyen anticuerpos anti-idiotípicos contra un anticuerpo objetivo del antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; o un anticuerpo contra el gangliósido GD2.

Un anticuerpo ejemplar capaz de ser purificado según la presente invención es un anticuerpo que reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), denominado como "un anticuerpo contra el EGFR" o un "anticuerpo anti-EGFR", descrito en la patente de EE.UU. Nº 6.235.883, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Un anticuerpo contra el EGFR incluye, pero no se limita a, todas las variaciones de los anticuerpos según se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.235.883. En la materia se conocen muchos otros anticuerpos contra el EGFR, y pueden generarse anticuerpos adicionales mediante medios conocidos y aún por descubrir. Un anticuerpo preferido contra el EGFR es un anticuerpo monoclonal completamente humano capaz de inhibir la unión del EGF al receptor del EGF. La purificación de un anticuerpo contra el EGFR usando una sal doble de CIH según la presente invención se describe en el presente documento en el Ejemplo 1.

Algunas proteínas ejemplares adicionales son tres anticuerpos monoclonales de IgG con las siguientes denominaciones: mAb1, mAb2, y mAb3. La purificación de estos anticuerpos monoclonales según la presente invención se describe en el presente documento en el Ejemplo 2.

La invención es también particularmente aplicable a proteínas, en particular a proteínas de fusión, que contienen uno o más dominios constantes de anticuerpo de inmunoglobulina, preferiblemente un dominio Fc de un anticuerpo. El "dominio Fc" se refiere a la porción del anticuerpo que es responsable de la unión a los receptores de anticuerpo en las células. Un dominio Fc puede contener 1, 2 o todos de los siguientes: el dominio constante pesado 1 (CH1), el dominio constante pesado 2 (CH2), el dominio constante pesado 3 (CH3), y la región de bisagra. El dominio Fc de la IgG1 humana contiene, por ejemplo, el dominio, CH2 y el dominio CH3 y la región de bisagra, pero no el dominio CH1. Véase, por ejemplo, C. A. Hasemann y J. Donald Capra, Immunoglobins: Structure and Function, en William E. Paul, ed. Fundamental Immunology, segunda edición, 209, 210-218 (1989). Según se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una fusión de toda o parte de al menos dos proteínas haciendo uso de la tecnología del ADN recombinante o mediante otro medio conocido en la materia.

Un ejemplo de una proteína que contiene Fc capaz de ser purificada según la presente invención es la proteína de fusión receptor del factor de necrosis tumoral-Fc (TNFR:Fc). Según se usa en el presente documento, el término "TNFR" (receptor del factor de necrosis tumoral) se refiere a una proteína con una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente similar a la secuencia del receptor del factor de necrosis tumoral de mamífero natural, o a un fragmento del mismo, tal como el dominio extracelular. La actividad biológica para el propósito de determinar la similitud sustancial es la capacidad de unirse al factor de necrosis tumoral (TNF), para transducir una señal biológica iniciada por la unión del TNF a una célula, y/o a presentar una reactividad cruzada con anticuerpos anti-TNFR creados frente al TNFR. Un TNFR puede ser cualquier TNRF de mamífero, incluyendo murino y humano, y se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.395.760, en la patente de EE.UU. Nº 5.945.397 y en la patente de EE.UU. Nº 6.201.105, todas las cuales se incorporan al presente documento como referencia. La TNFR:Fc es una proteína de fusión con todo o parte de un dominio extracelular de cualquiera de los polipéptidos del TNFR, incluyendo el TNFR p55 y p75 humanos fusionados a una región Fc de un anticuerpo. Una TNFR:Fc ejemplar es una proteína de fusión dimérica formada por el ligando extracelular-porción de unión al receptor del factor de necrosis tumoral humano de 75 kDa unido a la porción Fc de la IgG1 humana procedentes de fuentes naturales (no recombinantes). La purificación de la TNFR:Fc ejemplar según la presente invención se describe en el presente documento en el Ejemplo 2, a continuación.

Algunas proteínas adicionales capaces de ser purificadas según la presente invención incluyen antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de ellos. Dichos antígenos se desvelan en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani y col., eds., Kobe, Japón, 1996). Unas proteínas CD similares se desvelan en los subsiguientes seminarios. Algunos ejemplos de dichos antígenos incluyen CD27, CD30, CD39, CD40 y ligandos de los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.). Muchos de los antígenos CD son miembros de la familia de

receptores del TNF, que también incluye el ligando 41BB y OX40. Los ligandos son a menudo miembros de la familia del TNF, como son el ligando 41BB y el ligando OX40.

Un ligando ejemplar capaz de ser purificado según la presente invención es un CD40 (CD40L). El ligando natural de mamífero CD40 es una citocina y un polipéptido de membrana de tipo II, con formas solubles que contienen la región extracelular del CD40L o un fragmento de ella. Según se usa en el presente documento, el término "CD40L" se refiere a una proteína con una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente similar a la secuencia de un ligando de mamífero natural CD40 o un fragmento del mismo, tal como la región. Según se usa en el presente documento, el término "ligando CD40" se refiere a cualquier ligando CD40 de mamífero, incluyendo las formas murina y humana, según se describe en la patente de EE.UU. N° 6.087.329, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. La actividad biológica para el propósito de determinar la similitud sustancial es la capacidad de unirse al receptor CD40. Una forma de realización preferida del CD40L soluble humano es una proteína de fusión trimérica CD40L con un cierre oligomerizante de 33 aminoácidos (o "cierre de leucina") además de una región extracelular del CD40L humano, según se describe en la patente de EE.UU. N° 6.087.329. La secuencia de 33 aminoácidos trimeriza espontáneamente en disolución.

Además, otras muchas de las proteínas que son capaces de ser purificadas según los procedimientos de purificación mejorados de la presente invención incluyen muchas proteínas de valor comercial, económico, farmacológico, diagnóstico o terapéutico. Dichas proteínas pueden ser monoméricas con multiméricas. Estas proteínas incluyen, pero no se limitan a, una proteína o una porción de una proteína idéntica, o sustancialmente similar, a una de las siguientes proteínas: un ligando flt3, eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, ligando Fas, ligando para el activador del receptor de NF-kappa B (RANKL), ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de las colonias de granulocitos, factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos, factor de crecimiento de los mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, RANTES, hormona del crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento y insulínoides, hormona paratiroidea, interferones, factores de crecimiento nervioso, glucagón, interleucinas de la 1 hasta la 18, factores estimulantes de colonias, linfotóxina- β , factor de necrosis tumoral, factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M y diversos ligandos para moléculas de la superficie celular ELK y Hek (tales como los ligandos para cinasas relacionadas con eph (LERKS). Las descripciones de las proteínas que pueden estabilizarse según los procedimientos inventivos pueden encontrarse, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. Vol. II (Aggarwal y Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay y Leigh, eds., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y The Cytokine Handbook (A. W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1991).

Algunas proteínas adicionales capaces de ser purificadas según la presente invención son receptores para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o proteínas sustancialmente similares a dichos receptores o un fragmento de los mismos tales como los dominios extracelulares de dichos receptores. Estos receptores incluyen, además de ambas formas del receptor del factor de necrosis tumoral (denominadas p55 y p75) ya descritas: receptores de la interleucina-1 (tipo 1 y 2), receptor de la interleucina-4, receptor de la interleucina-15, de la interleucina-17, de la interleucina-18, receptor del factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos, receptor del factor estimulante de las colonias de granulocitos, receptores para oncostatina-M y factor inhibidor de leucemia, activador del receptor de NF kappa B (RANK), receptores para TRAIL, y receptores que comprenden dominios de muerte, tal como Fas o el receptor inductor de apoptosis (AIR). Las proteínas de interés también incluyen anticuerpos que se unen a cualquiera de estos receptores.

Las proteínas de interés capaces de ser purificadas según la presente invención también incluyen proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos. Algunos ejemplos incluyen polipéptidos que son idénticos o sustancialmente similares a las siguientes proteínas o porciones de las siguientes proteínas o sus ligandos: miembros de la familia de la metaloproteínasa-desintegrina, varias cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador tisular del plasminógeno, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista IL-2, alfa-1 antitripsina, enzima convertidora del TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente y numerosas otras enzimas y sus ligandos. Las proteínas de interés también incluyen anticuerpos que se unen a las proteínas enzimáticamente activas mencionadas anteriormente o a sus ligandos.

Algunas proteínas adicionales de interés capaces de ser purificadas según la presente invención son conjugados con un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Dichas sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como una enterotoxina estafilocócica); isótopos de yodo (tales como yodo-125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como Cy5.5.18); y proteínas de inactivación de ribosomas (tales como bouganina, gelonina, o saporina-S6). Algunos ejemplos de anticuerpos o de conjugados de anticuerpo/citotoxina o de anticuerpo/luminóforo contemplados por la invención incluyen aquellos que reconocen cualquiera de los siguientes antígenos: subunidades de CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-6, PDGF- β , VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, receptor de VEGF, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con el cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína asociada a tumores TAG-72, el antígeno SK-1,

epítomos asociados con tumores que están presentes en niveles elevados en el suero de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos asociados con el cáncer o proteínas expresadas en células de cáncer de mama, de colon, de células escamosas, de próstata, pancreático, de pulmón y/o de riñón, y/o en células de melanoma, de glioma o de neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, TNF- α , la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intracelular-3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glucoproteína de plaquetas gp IIb/IIIa, cadena pesada de la miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa-factor tisular), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a los linfocitos T citotóxicos), receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno de HLA-DR, L-selectina, IFN- γ , virus respiratorio sincitial, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

La presente invención es particularmente útil en el contexto de la producción y la purificación comercial de proteínas, especialmente de proteínas producidas recombinantemente. Aumentando la capacidad de una etapa en el esquema de purificación global de una proteína comercialmente importante, la presente invención puede reducir el número de ciclos requeridos para purificar un lote de proteína. La presente invención aumenta por lo tanto la eficacia de la purificación de proteínas, sin reducir la calidad del producto proteico. Para la producción a gran escala de productos biológicos comercialmente importantes, por ejemplo, esto representa un ahorro significativo de tiempo y coste.

Habiendo sido descrita la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración, y no de limitación.

Ejemplo I

Se probaron varias combinaciones de disoluciones salinas para comprobar su facultad de aumentar la capacidad dinámica de una columna de CIH usada para purificar un anticuerpo frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (anticuerpo frente al EGFR).

En primer lugar se determinó el intervalo de concentraciones eficaces para las sales ("sales") y para dos tampones salinos para el anticuerpo frente al EGFR mediante la representación gráfica de las curvas de precipitación para las sales individuales y sus combinaciones. Se usaron las siguientes sales: citrato sódico, fosfato sódico, acetato sódico y fosfato sódico. Todos los tampones se elaboraron pesando los compuestos químicos apropiados, disolviendo a aproximadamente el 80% del volumen final, y ajustando el pH usando HCl 11,2 N o NaOH 10 hasta pH 6,0, a temperatura ambiente (21-23°C), y completando el volumen. Para aplicaciones comerciales, sin embargo, las sales tamponadas se preparan mezclando una sal con su forma ácida, tal como citrato sódico con ácido cítrico, para conseguir una concentración iónica exacta, más que para ajustar a un pH con otros ácidos o bases.

La preparación de anticuerpos usada para la prueba era un diluyente parcialmente purificado procedente de una columna previa con una concentración de aproximadamente 5 mg/ml de proteína. Los estudios de precipitación de este anticuerpo usando tampones individuales se realizaron como sigue: la preparación del anticuerpo se mezcló con la disolución madre de tampón para obtener una concentración final de sal de entre 0 y 1,2 M. Las muestras se incubaron durante 20 minutos, se centrifugaron durante 10 minutos a aproximadamente 6.000 x g, se filtraron y se ensayó el sobrenadante para la proteína. La muestra de control se diluyó con agua, y se tomó la lectura de su sobrenadante como una recuperación del 100%. Se generó una curva de precipitación salina para el anticuerpo mediante la representación gráfica de la cantidad de proteína en el sobrenadante (porcentaje de recuperación en comparación con el control) frente a la molaridad de la sal. El porcentaje de recuperación disminuyó significativamente a más de aproximadamente 0,6 M para el citrato sódico, mientras que el porcentaje de recuperación disminuyó significativamente a más de aproximadamente 0,8 M para el tampón de fosfato sódico, a más de aproximadamente 1,2 M para el acetato sódico, y a más de aproximadamente 0,6 M para el sulfato sódico. Usando esta información se generó una segunda serie de curvas de precipitación salina para combinaciones de dos sales en las que la concentración de la primera sal se mantenía constante mientras que se aumentaba la concentración de la segunda sal. Las curvas de precipitación se generaron incubando el anticuerpo y la mezcla de dos sales durante veinte minutos y centrifugando según se describió para las disoluciones salinas individuales. Por ejemplo, el citrato sódico se mantuvo a 0,55 M mientras que la concentración de fosfato sódico se aumentaba, y se midió el porcentaje de recuperación del anticuerpo del sobrenadante y se comparó con el del control. También se realizó la prueba inversa manteniendo el fosfato sódico 0,4 M constante mientras se variaba la concentración de sulfato sódico. Los resultados se muestran en las Figuras 1A hasta E. Estos resultados muestran que concentraciones reducidas de las sales conjuntas en comparación con una sal individual podrían precipitar la proteína. Esto indicó que concentraciones reducidas de cada sal en combinación producían unos efectos hidrófobos equivalentes en comparación con concentraciones mayores de cada sal individual.

Los resultados de las precipitaciones salinas individual y doble proporcionaron un intervalo de concentraciones salinas individuales y combinadas para la determinación de la capacidad dinámica de una columna de CIH para el anticuerpo frente al EGFR. La capacidad dinámica se determinó según el siguiente protocolo. Se "acondicionó" una preparación de anticuerpo de aproximadamente 5 mg/ml diluyendo 1:1 con la apropiada disolución madre salina tamponada (2x). La disolución madre salina se añadió a la preparación de anticuerpo a una tasa del 1- 2% en volumen por minuto con agitación. Se realizó una dilución salina adicional según fue necesario para proporcionar un intervalo de concentraciones salinas, y la mezcla de la preparación de anticuerpo y el tampón salino se filtró con un

filtro de celulosa de 2 μ m. Esta mezcla era la carga de la cromatografía de interacciones hidrófobas (CIH). La columna de CIH usada para determinar la capacidad dinámica de las combinaciones salinas individuales y dobles era una columna Millipore (Bellerica, MA) VANTAGE con un diámetro de 1,1 cm y empaquetada a un volumen de columna (VC) de 8,5 mL (9 cm de altura del lecho) con resina TOYOPEARL™ BUTIL 650 M (TosoHaas). La columna se preparó regenerándola con hidróxido sódico 0,5 N a 180 cm/h durante 3 volúmenes de columna (VC), lavando con 3 VC a 180 cm/h con agua, y después equilibrando la columna a 180 cm/h con el apropiado tampón salino o combinación salina. Entonces se cargó la mezcla de carga a 90 cm/hy se lavó a 90 cm/h con 3 CV del mismo tampón salino (tampón de equilibrio). Para determinar la capacidad dinámica, las columnas se sobrecargaron con proteínas, de forma que las fracciones se recogieron durante la carga ("flujo continuo") y las etapas de lavado. El contenido en proteínas se determinó mediante absorción a 280 nm, o mediante geles SDS-PAGE. La concentración de carga en mg/ml de resina a la cual el % de saturación es cero se consideró como la capacidad dinámica del anticuerpo a esa concentración salina. La capacidad dinámica se determinó a partir de la representación gráfica de la carga de la CIH frente al porcentaje de saturación (BT) (concentración de flujo continuo/concentración de carga).

Entonces el anticuerpo se eluyó a 180 cm/h usando un comienzo de elución por etapas o gradiente por etapas con las condiciones de equilibrio hasta una concentración salina de 0,2 M. Se recogieron las fracciones y se realizó un análisis mediante SDS- PAGE en geles de Tris/Glicina Novex al 4-20% usando una tinción de plata (kit Pharmacia One-Plus™) para visualizar las bandas de proteínas.

Las dos concentraciones salinas fueron opcionalmente modificadas adicionalmente con objeto de estabilizar la preparación de anticuerpo monomérico a temperatura ambiente en lugar de a 4-8°C, y también para minimizar la formación de agregados en la muestra de anticuerpo. Por ejemplo, la capacidad dinámica de la columna para el anticuerpo usando tampón de fosfato sódico 0,4 M era de 43/ml-r (ml de resina); la capacidad dinámica del fosfato sódico 0,35 M era de 40 mg/ml-r, y la capacidad dinámica del fosfato sódico 0,3 M era de 38 mg/ml-r. Sin embargo, se encontró una pérdida de proteína del 25% que se producía con fosfato 0,5 M a temperatura ambiente, mientras que sólo se encontró una pérdida del 8% en 0,4 M durante hasta seis días a temperatura ambiente. Además, se encontró que el material que precipitó entre unas concentraciones salinas de 0,3 M y 0,4 M incluía prácticamente todos los agregados de alto peso molecular (HMW).

Además, la tasa a la cual se mezcló la disolución madre salina con la preparación de anticuerpo afectó a la estabilidad del anticuerpo. A una tasa del 2% de volumen/minuto, sólo se perdió aproximadamente el 2% de anticuerpo como fragmentos del monómero, por oposición al 12% de pérdida a un 10% de volumen/minuto.

Se determinaron las capacidades dinámicas de la columna de CIH para el anticuerpo frente al EGFR para las diversas sales individuales y combinadas, según se describió anteriormente, y se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Capacidades dinámicas del anticuerpo contra el EGFR con cuatro sales y sus combinaciones. Sólo se enumeran los aniones; los cationes fueron sodio para todas las sales

Condiciones Experimentales	Capacidad Dinámica (mg/ml-r)
Citrato 0,55 M	24
Fosfato 0,5 M	12
Sulfato 0,8 M	24
Acetato 1,2 M	5
Citrato 0,55 M / Sulfato 0,3 M	30
Acetato 0,6 M / Citrato 0,5 M	29
Fosfato 0,35 M / Citrato 0,6 M	39
Acetato 0,6 M / Sulfato 0,7 M	27
Citrato 0,5 M / Acetato 1 M	34
Sulfato 0,5 M / Acetato 1 M	33
Fosfato 0,4 M / Sulfato 0,3 M	15
Sulfato 0,5 M / Citrato 0,3 M	33
Sulfato 0,5 M / Fosfato 0,3 M	17
Citrato 0,3 M / Fosfato 0,6 M	35

La Tabla 1 muestra que las combinaciones de citrato/ sulfato, acetato/citrato, fosfato/citrato, acetato/sulfato, citrato/acetato, sulfato/acetato, sulfato/citrato y citrato/fosfato aumentaron la capacidad dinámica de la columna de CIH para el anticuerpo en factores que varían desde aproximadamente 1,5 hasta 2 veces o más que cada una de las sales sola. La combinación de fosfato/sulfato no aumentó la capacidad dinámica por las siguientes razones: el sulfato en combinación con el fosfato da como resultado un precipitado, de forma que se requerirán menores concentraciones de sulfato para evitar la precipitación. Estas bajas concentraciones mostraron ser demasiado bajas para mejorar la capacidad dinámica. Además, el fosfato y el acetato no mostraron ser una combinación eficaz debido a la precipitación resultante cuando se mezclaron las dos sales.

Ejemplo 2

Usando los mismos procedimientos a los descritos en el Ejemplo 1 se determinaron las capacidades dinámicas de cuatro proteínas adicionales para las sales individuales fosfato sódico y citrato sódico, y una combinación de dos sales de citrato sódico 0,55 M variando la concentración fosfato. Las proteínas adicionales que eran la proteína de fusión TNFR:Fc descrita anteriormente, y tres anticuerpos monoclonales denominados mAb1, mAb2 y mAb3. Los tres anticuerpos monoclonales se purificaron parcialmente y se obtuvieron como eluyentes a partir de otros tipos de columnas cromatográficas. La proteína de fusión TNFR:Fc se obtuvo como una proteína totalmente purificada. Las concentraciones de las proteínas usadas eran de entre 4-5 mg/ml, para este experimento en particular.

En primer lugar se determinaron para cada proteína las curvas de precipitación para citrato sódico y fosfato sódico, y después se determinó una curva de precipitación salina doble para citrato sódico 0,55 M variando el fosfato sódico. La concentración a la cual cada proteína comienza a precipitar se proporciona en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Concentraciones salinas a las cuales la proteína comienza a precipitar (tomadas a partir de las curvas de precipitación)

Proteína	Conc. de citrato sódico	Conc. de fosfato sódico	Combinación salina
MAb1	0,6 M	0,9 M	Citrato Na 0,55 M / Fosfato Na 0,4 M
MAb2	0,7 M	1,1 M	Citrato Na 0,55 M / Fosfato Na 0,4 M
MAb3	0,7 M	1,0 M	Citrato Na 0,55 M / Fosfato Na 0,2 M
TNFR:Fc	0,55 M	1,0 M	Citrato Na 0,4 M / Fosfato Na 0,2 M

De la Tabla 2 resulta evidente que las combinaciones de sales precipitaron las proteínas a concentraciones menores en comparación con las concentraciones de cada sal individual.

Se determinaron las capacidades dinámicas de estas proteínas en geles TOYOPEARL™ BUTIL 650M (TosoHaas) para las concentraciones salinas mostradas en la Tabla 2, usando el mismo procedimiento al descrito anteriormente para el anticuerpo frente al EGFR. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Capacidades dinámicas en las condiciones salinas enumeradas en la Tabla 2

Proteína	Citrato Na	Fosfato Na	Combinación
mAb1	37	20	49
mAb2	36	30	44
mAb3	21	12	25
TNFR:Fc	17	18	25

De nuevo, está claro que la combinación de sales aumentó la capacidad dinámica de las cuatro proteínas frente a la conseguida usando las sales individuales en entre 1,5 y 2 veces.

La presente invención no debe limitar su ámbito por las formas de realización específicas descritas en el presente documento, que pretenden ser simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los procedimientos y componentes funcionalmente equivalentes están en el ámbito de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán apreciables por los expertos en la materia a partir de la anterior descripción y los dibujos anexos. Dichas modificaciones pretenden estar comprendidas en el alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar una proteína que comprende mezclar una preparación que contiene la proteína con una disolución formada por una combinación de una primera sal y una segunda sal, cargar la mezcla en una columna de cromatografía de interacciones hidrófobas, y eluir la columna, en el que la primera y la segunda sales tienen diferentes valores liótropos, en el que al menos una sal tiene una capacidad tamponante a un pH al cual es estable la proteína, en el que la concentración de cada una de la primera sal y la segunda sal de la mezcla está entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1,0 M, y en el que la primera y la segunda sal se eligen de los grupos que consisten en citrato y sulfato, citrato y acetato, citrato y fosfato, acetato y sulfato, y sulfato y fosfato.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el pH de la mezcla cargada en la columna está entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la columna se eluye con una disolución con un pH entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las sales se eligen de entre sales de sodio, sales de amonio y sales de potasio.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las sales son sales de sodio.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la proteína es una proteína de fusión o un anticuerpo.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión Fc.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente diluir la proteína.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente filtrar la proteína.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente formular la proteína.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente liofilizar la proteína.

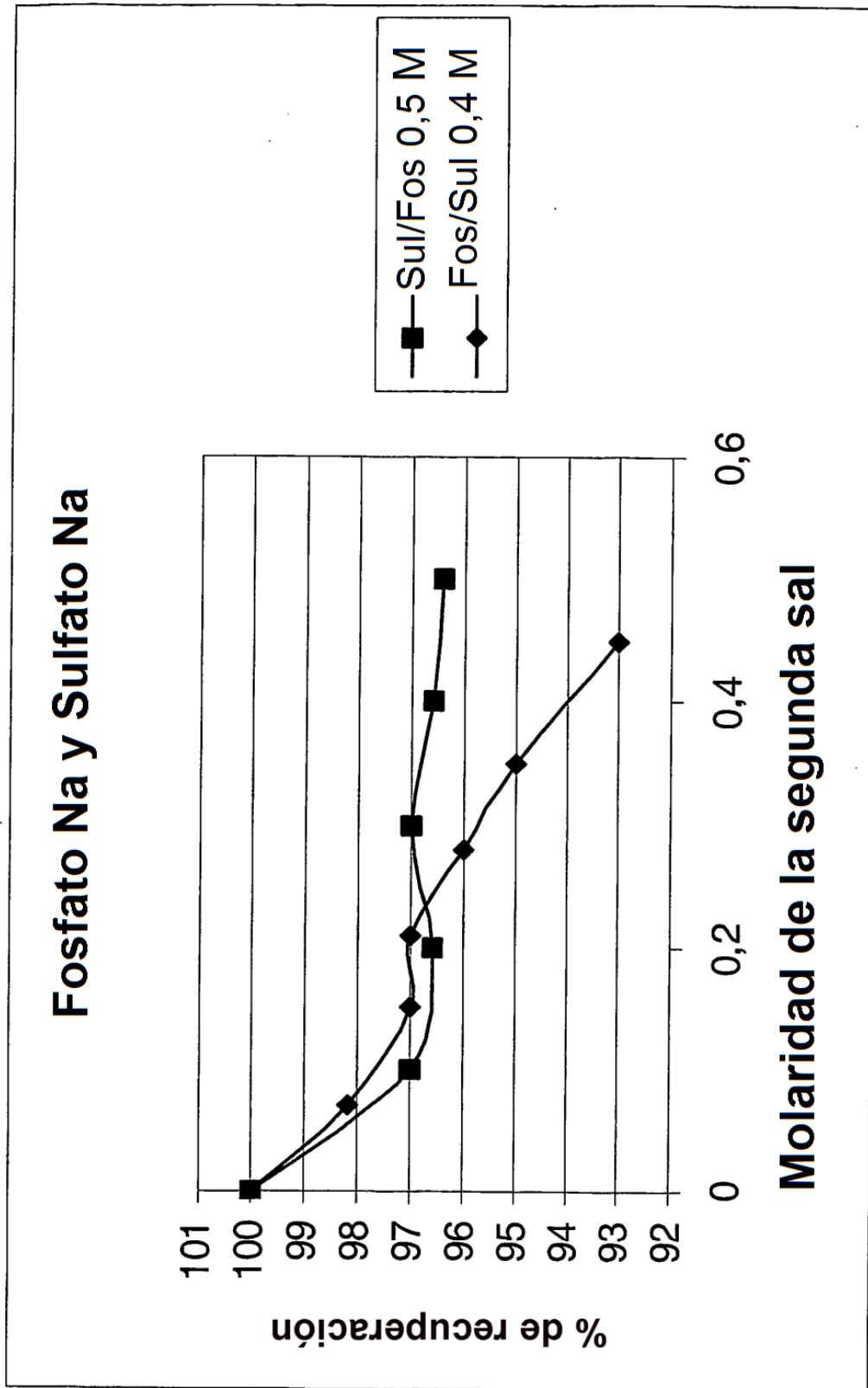


Figura 1A

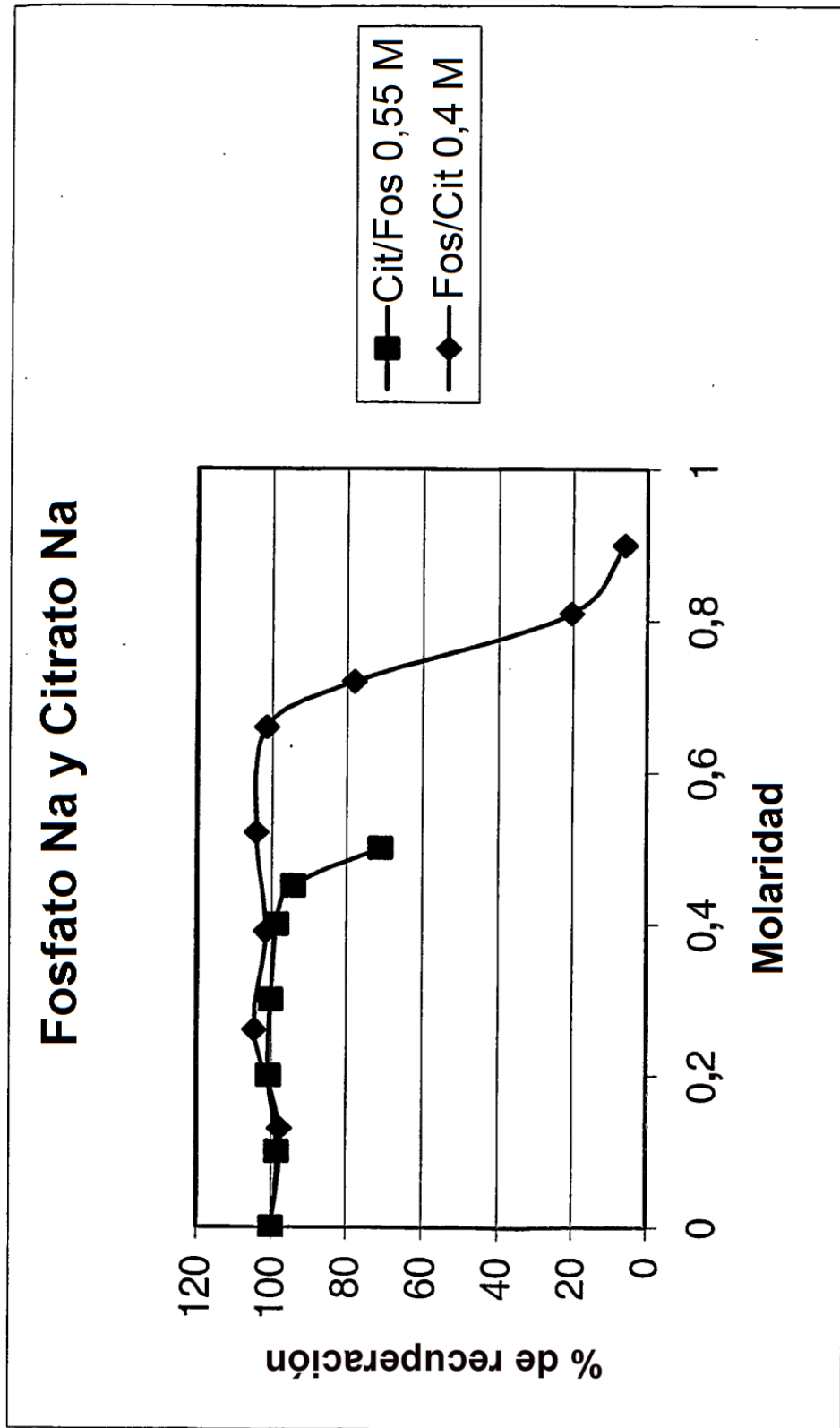


Figura 1B

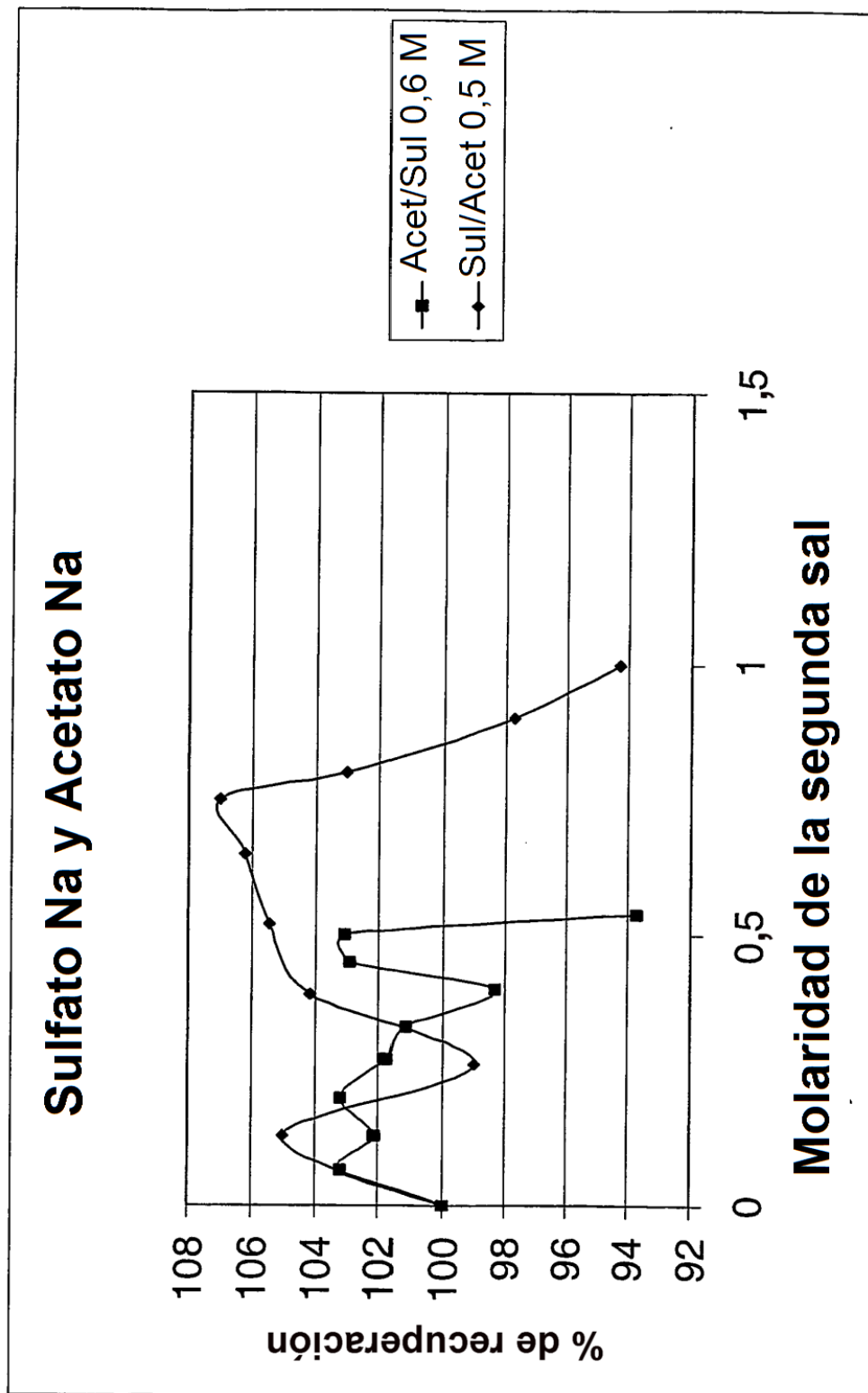


Figura 1C

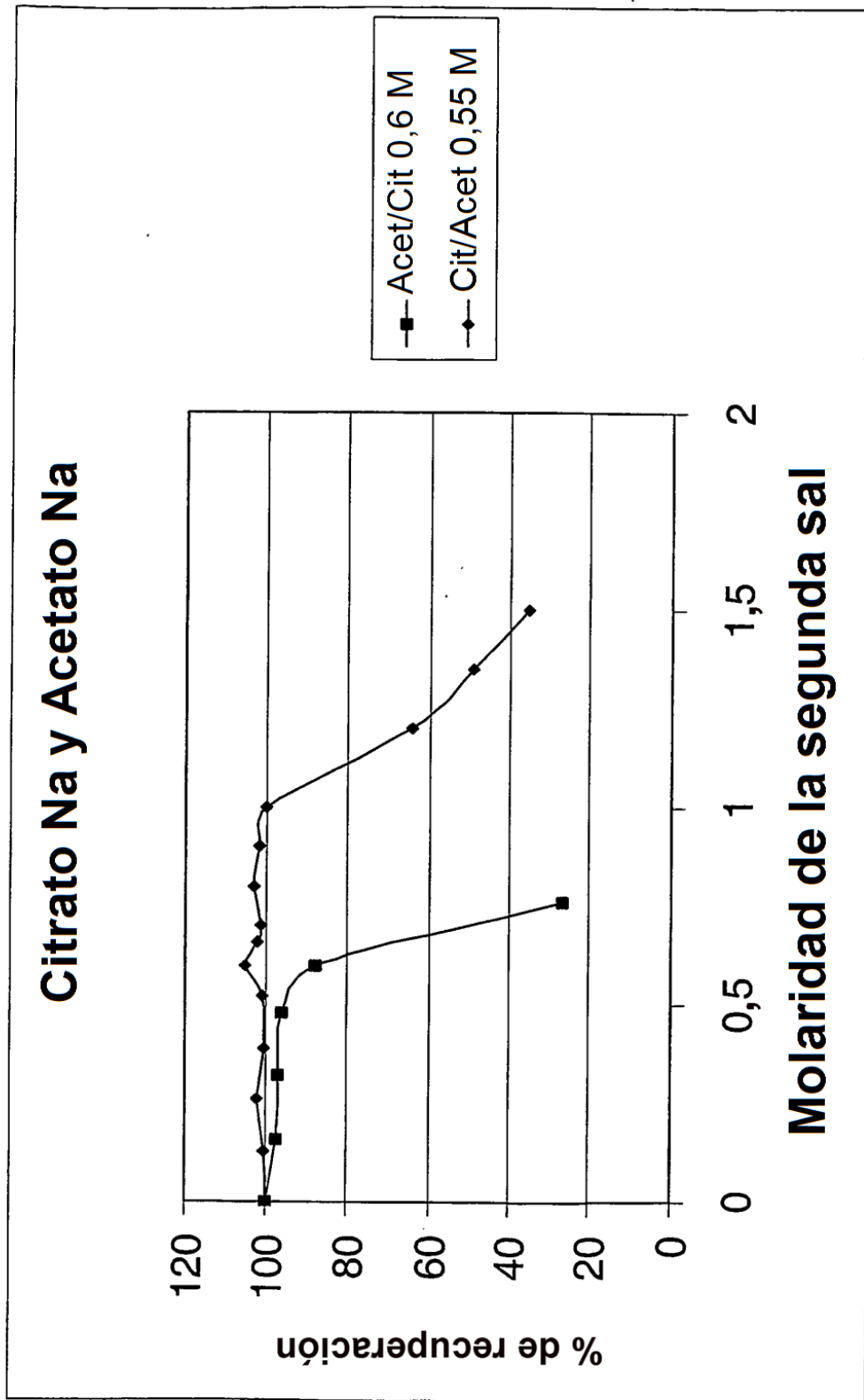


Figura 1D

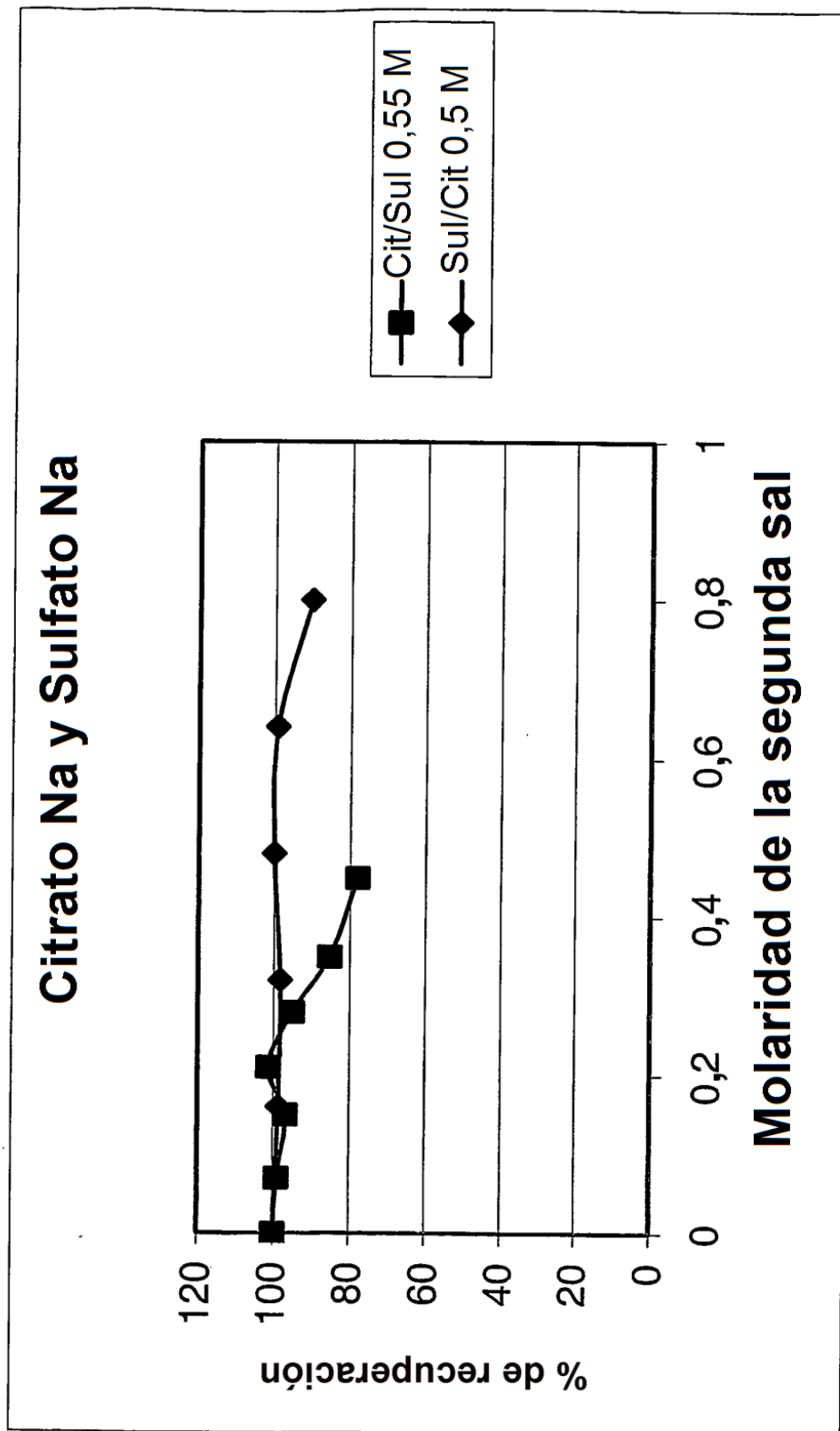


Figura 1E