



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 945**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02794380 .2**
96 Fecha de presentación : **20.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1463942**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54 Título: **Métodos para la purificación de proteína.**

30 Prioridad: **21.12.2001 US 343363 P**
08.01.2002 US 347189 P
12.03.2002 US 364272 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2009

73 Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320, US

72 Inventor/es: **Vedantham, Ganesh;**
Brooks, Clayton, A., III;
Reeder, Joanne, M. y
Goetze, Andrew, M.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 322 945 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

Métodos para la purificación de proteína.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de tres solicitudes provisionales, la solicitud estadounidense No. 60/343.363, presentada el 21 de diciembre de 2001, la solicitud estadounidense No. 60/347.189, presentada el 8 de enero de 2002 y la solicitud estadounidense No. 60/364.272, presentada el 12 de marzo de 2002.

Campo de la invención

10 La invención se relaciona con la purificación de proteína, en particular, con la purificación utilizando cromatografía sobre hidroxiapatita.

Antecedentes

15 Se emplean a menudo las Proteínas A y G para purificar anticuerpos por medio de cromatografía de afinidad. Ver, por ejemplo R. Vola y colaboradores (1994), Cell Biophys. 24-25: 27-36; Aybay e Imir (2000), J. Immunol. Methods 233 (1-2): 77-81; Ford y colaboradores (2001), J. Chromatogr. B 754: 427-435; DE 42 05 938. Estas proteínas son útiles debido a que se enlazan a una porción constante (F_C) de muchos anticuerpos diferentes. Las proteínas recombinantes de fusión que incluyen una porción F_C de un anticuerpo IgG se pueden purificar utilizando métodos similares.

20 Cuando se produce una proteína para uso farmacológico, es importante remover contaminantes tóxicos o inmunogénicos, tal como otras proteínas. Específicamente, la Proteína A es inmunogénica y, en grandes cantidades, potencialmente tóxica. Alguna Proteína A puede filtrarse dentro de una muestra durante cromatografía de afinidad cuando se utiliza como absorbente la Proteína A fijada a un soporte sólido. Ver, por ejemplo, Bensinger y colaboradores (1984), J. Biol. Response Modif. 3: 347-351; Ventura y colaboradores (1987), Cancer Treat. Rep. 71 (4): 411-413.

25 Se han separado los anticuerpos monoclonales biespecíficos de otros anticuerpos enlazándolos y eluyéndolos de hidroxiapatita posteriormente a una purificación previa por medio de cromatografía de afinidad utilizando Proteína A fijada a un soporte sólido como adsorbente. Tarditi y colaboradores (1992), J. Chromatography 599: 13-20; Ford y colaboradores (2001), J. Chromatography B 754: 427-435. También se han enlazado y eluido anticuerpos monoclonales de hidroxiapatita. Ahmad (1999), Ceramic Hydroxyapatite as a Polishing Step for Monoclonal Antibody Purification, Resumen de la Recovery of Biological Products Meeting #9 en Whistler, British Columbia.

30 La presente invención proporciona un proceso simplificado y de amplia aplicación para utilizar cromatografía sobre hidroxiapatita para la purificación de anticuerpos y de otras proteínas.

Resumen de la invención

35 La cromatografía de afinidad es una poderosa herramienta para purificación de proteínas tal como anticuerpos y proteínas de fusión F_C . Sin embargo, si se fabrican las proteínas para uso terapéutico, la presencia de otras proteínas, incluida una proteína usada como parte de un absorbente de afinidad, que puede filtrarse dentro de una muestra durante la cromatografía de afinidad, es motivo de preocupación. Además, pueden estar presentes otros contaminantes de proteína en una muestra, tales como, por ejemplo, proteínas derivadas de células huésped que producen la proteína que está siendo purificada. La invención proporciona, entre otras cosas, una técnica de alto rendimiento para resolver estos problemas a través de cromatografía sobre hidroxiapatita en un modo de flujo que involucra un procesamiento mínimo.

40 Por lo tanto, la invención proporciona, en un aspecto, un método para separar una proteína de una segunda proteína que comprende someter la proteína a cromatografía sobre hidroxiapatita cuando (1) la proteína ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando la segunda proteína fijada a un soporte sólido como absorbente, (2) la segunda proteína puede enlazarse a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, y (3) la proteína no se enlaza a hidroxiapatita bajo las condiciones utilizadas. La proteína puede incluir una porción F_C de un anticuerpo. Opcionalmente, la proteína puede ser TNFR: F_C . La segunda proteína puede ser Proteína A o Proteína G.

45 La invención proporciona además un método para purificar una proteína de una muestra que incluye a la proteína y al menos una proteína contaminante que comprende someter a la muestra a cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde la proteína es separada de al menos una proteína contaminante por medio de cromatografía sobre hidroxiapatita en una solución en la cual se lleva a cabo la cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde la mayor parte de las moléculas de la proteína son recuperadas en el flujo y el lavado, en donde la proteína ha sido previamente purificada por cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como un absorbente, y en donde la segunda proteína se enlaza a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina. La segunda proteína puede o no estar presente en un nivel detectable en la muestra, y la proteína se puede separar de la segunda proteína por medio de cromatografía sobre hidroxiapatita en la solución utilizada. La proteína y al menos una proteína contaminante pueden haber sido secretadas en un medio de cultivo por células animales cultivadas, tales como las células CHO. La proteína puede incluir una porción F_C de un anticuerpo y puede, por ejemplo, ser TNFR: F_C o un anticuerpo. La segunda proteína puede ser Proteína A y Proteína G. La solución en la cual se realiza la cromatografía sobre

hidroxiapatita puede incluir un amortiguador de fosfato de sodio en una concentración aproximadamente entre 5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, opcionalmente aproximadamente entre 15 milimolar y aproximadamente 35 milimolar, y puede tener un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,6.

5 La invención proporciona además, en otro aspecto, un método para separar una proteína recombinante de fusión de una segunda proteína que comprende someter a la proteína recombinante de fusión a cromatografía sobre hidroxiapatita cuando (1) la proteína recombinante de fusión ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando la segunda proteína fijada a un soporte sólido como un absorbente y (2) la proteína recombinante de fusión incluye una porción F_C de un anticuerpo y parte o todo de una proteína que no es un anticuerpo. En una
10 modalidad, la proteína recombinante de fusión puede ser TNFR: F_C .

En aún otro aspecto, la invención abarca además un método para separar una proteína recombinante de fusión de una segunda proteína que comprende someter a la proteína recombinante de fusión a cromatografía sobre hidroxiapatita cuando (1) la proteína recombinante de fusión no se enlaza a la hidroxiapatita y la segunda proteína se enlaza a
15 hidroxiapatita bajo las condiciones utilizadas, (2) la proteína recombinante de fusión ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando a la segunda proteína fijada a un soporte sólido como un absorbente, y (3) la proteína recombinante de fusión incluye a la región F_C de un anticuerpo.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para purificar una proteína recombinante de fusión de una muestra que contiene a la proteína recombinante de fusión y al menos una proteína contaminante que comprende someter a la muestra a cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde la proteína recombinante de fusión incluye una porción F_C de un anticuerpo y parte o todo de una proteína que no es un anticuerpo, y en donde la proteína recombinante de fusión ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente. La mayoría de las moléculas de la proteína recombinante de fusión se pueden
25 recuperar en el flujo y el lavado. La proteína recombinante de fusión puede ser TNFR: F_C y la segunda proteína puede ser Proteína A o Proteína G. La cromatografía sobre hidroxiapatita se puede llevar a cabo en una solución que incluye un amortiguador de fosfato de sodio, opcionalmente en una concentración entre 5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar o aproximadamente entre 15 milimolar y aproximadamente 35 milimolar y opcionalmente a un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,6. La proteína recombinante de fusión y/o al menos una proteína contaminante pueden ser secretadas dentro de un medio de cultivo por células animales cultivadas, opcionalmente células CHO. En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método para separar TNFR: F_C de Proteína A que comprende someter a TNFR: F_C a cromatografía sobre hidroxiapatita después de la purificación de TNFR: F_C por medio de cromatografía de afinidad utilizando Proteína A fijada a un soporte sólido como adsorbente.

35 En una modalidad adicional, la invención proporciona un método para purificar TNFR: F_C que comprende someter una muestra que contiene TNFR: F_C y al menos una proteína contaminante a cromatografía sobre hidroxiapatita bajo condiciones en donde la mayor parte de las moléculas de TNFR: F_C son recuperadas en el flujo y lavado.

Una modalidad adicional proporciona un método para purificar TNFR: F_C que comprende someter TNFR: F_C a cromatografía sobre hidroxiapatita bajo condiciones donde TNFR: F_C no se enlaza a la hidroxiapatita, por lo cual TNFR: F_C se separa de al menos una proteína contaminante.

La invención proporciona además, en aún otro aspecto, un método para separar una proteína recombinante de fusión de proteínas de la célula huésped, que comprende cargar una muestra que contiene la proteína recombinante de fusión sobre hidroxiapatita, sometiendo a la proteína recombinante de fusión a cromatografía sobre hidroxiapatita bajo condiciones donde la proteína recombinante de fusión no se enlaza a la hidroxiapatita, y recuperando una muestra que contiene a la proteína recombinante de fusión en el flujo y lavado combinados.

En aún otro aspecto, se proporciona un método para separar una proteína de proteínas de la célula huésped que comprende someter una muestra que contiene a la proteína y al menos a una proteína de la célula huésped a cromatografía sobre hidroxiapatita, por lo cual se separa la proteína de la menos una proteína de la célula huésped, en donde la proteína incluye un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, en donde se recuperan la mayoría de las moléculas de la proteína en el flujo y lavado, y en donde tanto la proteína como la proteína de la célula huésped han sido secretadas en un medio de cultivo por parte de células animales cultivadas, tales como, por ejemplo células CHO. La concentración de las proteínas de la célula huésped puede ser menor aproximadamente a 100 partes por millón, y la proteína puede ser TNFR: F_C .

También se describe la preparación purificada de TNFR: F_C en donde la preparación incluye menos de 3 partes por millón de Proteína A y menos de 100 partes por millón de proteínas de la células animal huésped, opcionalmente menos de 2 partes por millón de Proteína A y/o menos de 75 partes por millón de proteínas de la célula huésped.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el perfil de elusión de la corrida en una columna de hidroxiapatita en fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8 sobre la cual se cargó una muestra que contiene TNFR: F_C como especie principal, como se describe en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 *Adsorbente*: Un adsorbente es al menos una molécula fijada a un soporte sólido o al menos una molécula que es, por sí misma, un sólido, que se utiliza para llevar a cabo la cromatografía.

10 *Cromatografía de afinidad*: La cromatografía de afinidad es cromatografía que utiliza las interacciones específicas reversibles entre biomoléculas, por ejemplo, la habilidad de la Proteína A para enlazarse a una porción F_C de un anticuerpo IgG, en vez de las propiedades generales de una molécula, tales como el punto isoelectrico, la hidrofobicidad, o el tamaño, para efectuar la separación cromatográfica. En la práctica, la cromatografía de afinidad involucra el uso de un adsorbente, tal como Proteína A fijada a un soporte sólido, para separar cromatográficamente moléculas que se enlazan más o menos firmemente al adsorbente. Ver, Ostrove (1990) en Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology 182: 357-379.

15 *Anticuerpo*: Un anticuerpo es una proteína o complejo de proteínas, cada una de las cuales incluye al menos un dominio variable del anticuerpo inmunoglobulina y al menos un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de cadena única, anticuerpos diméricos, o algunos complejos de orden superior de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos heterodiméricos.

20 *Cromatografía*: Cromatografía es la separación de moléculas químicamente diferentes en una mezcla por medio de percolación de la mezcla a través de un adsorbente, que adsorbe o retiene diferentes moléculas más o menos fuertemente. Las moléculas que son menos fuertemente adsorbidas o retenidas por el adsorbente son liberadas del adsorbente bajo condiciones donde aquellas más fuertemente adsorbidas o retenidas no lo son.

25 *Dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina*: Un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina es un dominio de inmunoglobulina que es idéntico o sustancialmente similar a un dominio C_L , C_H1 , C_H2 , C_H3 o C_H4 de origen humano o animal. Ver, por ejemplo, Charles A Hasemann y J. Donald Capra, Immunoglobulins: Structure and Function, en William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989).

30 *Contaminante*: Un contaminante es cualquier molécula foránea o indeseada, particularmente una macromolécula biológica tal como un ADN, un ARN, o una proteína, diferente a la proteína que está siendo purificada que está presente en una muestra de una proteína que está siendo purificada. Los contaminantes incluyen, por ejemplo, otras proteínas de las células que secretan a la proteína que está siendo purificada y proteínas, tales como la Proteína A, que son parte de un adsorbente utilizado para cromatografía de afinidad que puede lixivarse dentro de una muestra durante la cromatografía de afinidad.

35 *Porción F_C de un anticuerpo*: La porción F_C de un anticuerpo incluye a los dominios de inmunoglobulina humana o animal C_H2 y C_H3 o a los dominios de inmunoglobulina sustancialmente similares a aquellos. Para los propósitos de la invención, la actividad biológica de una porción de F_C de un anticuerpo para el propósito de determinar la similitud sustancial es la habilidad para ser enlazada por una segunda proteína que se enlaza a las porciones de F_C de ocurrencia natural de anticuerpos, tales como la Proteína A o la Proteína G. Para discusión, ver Hasemann y Capra, ver más arriba, en las páginas 212-213.

45 *Proteínas de la célula huésped*: Las proteínas de la célula huésped son proteínas codificadas por el genoma de ocurrencia natural de una célula huésped dentro de la cual se introduce el ADN que codifica a una proteína que va a ser purificada. Las proteínas de la célula huésped pueden ser contaminantes de la proteína que va a ser purificada, cuyos niveles se pueden reducir por medio de purificación. Las proteínas de la célula huésped se pueden analizar por medio de cualquier método apropiado incluyendo electroforesis en gel y coloración y/o el ensayo de ELISA, entre otros.

50 *Cromatografía sobre hidroxiapatita*: La cromatografía sobre hidroxiapatita es cromatografía que utiliza hidroxiapatita cerámica como adsorbente. Ver, por ejemplo, Marina J. Gorbunoff (1990), Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns, en Guide to Protein Purification, Murray P. Deutscher, ed., Methods in Enzymology 182: 329-339.

55 *Anticuerpo IgG*: Para los propósitos de la invención, un anticuerpo IgG es un anticuerpo que incluye al menos un dominio constante de inmunoglobulina tipo γ . Para discusión, ver Hasemann y Capra, ver más arriba, en la página 226.

60 *Polipéptido*: Para los propósitos de la invención, se utiliza en forma intercambiable “polipéptido” con “proteína”.

65 *Proteína A*: La Proteína A es una proteína originalmente descubierta en la pared celular de Estafilococo que se enlaza específicamente a una porción de F_C de anticuerpo IgG. Para los propósitos de la invención, “Proteína A” es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína A de Estafilococo, incluyendo las formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de la Proteína A. Para los propósitos de la invención, la actividad biológica de la Proteína A con el objeto de determinar la similitud sustancial es la capacidad de enlazarse a una porción de F_C del anticuerpo IgG.

ES 2 322 945 T3

Proteína G: La Proteína G es una proteína originalmente descubierta en la pared celular de *Estreptococo* que se enlaza específicamente a una porción de F_C de un anticuerpo IgG. Para los propósitos de la invención, "Proteína G" es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína G de *Estreptococo*, incluyendo las formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de la Proteína G. Para los propósitos de la invención, la actividad biológica de la Proteína G con el objeto de determinar la similitud sustancial es la capacidad de enlazarse a una porción de F_C del anticuerpo IgG.

Proteína LG: La Proteína LG es una proteína recombinante de fusión que se enlaza a los anticuerpos IgG que incluyen porciones tanto de Proteína G (ver la definición anterior) como de Proteína L. La Proteína L fue originalmente aislada de la pared celular de *Peptoestreptococos*. La Proteína LG fue originalmente aislada de la pared celular de *Peptoestreptococos*. La Proteína LG incluye dominios de enlazamiento de IgG tanto de Proteína L como G. Vola y colaboradores (1994) *Cell. Biophys.* 24-25: 27-36. Para los propósitos de la invención, "Proteína LG" es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína LG, incluyendo las formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de la Proteína LG. Para los propósitos de la invención, la actividad biológica de la Proteína LG con el objeto de determinar la similitud sustancial es la capacidad para enlazarse a un anticuerpo IgG.

Purificación: Purificar una proteína significa reducir las cantidades de elementos foráneos o indeseados, especialmente macromoléculas biológicas tales como proteínas o ADN, que pueden estar presentes en una muestra de la proteína. La presencia de proteínas foráneas se puede analizar por medio de cualquier método apropiado que incluye electroforesis en gel y coloración y/o ensayo de ELISA. La presencia de ADN se puede analizar por medio de cualquier método apropiado que incluye electroforesis en gel y coloración y/o ensayos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa.

Proteína recombinante de fusión: Una proteína recombinante de fusión es cualquier proteína que incluya parte o todo de dos o más proteínas que no están fusionadas en su estado natural. Los ejemplos de tales proteínas incluyen, pero no se limitan al activador del receptor humano de NF-KapaB fusionado a una porción de F_C de un anticuerpo (TEKdelta: F_C), y el receptor del factor de necrosis tumoral fusionado a una porción de F_C de un anticuerpo (TNFR: F_C).

Separación: Una proteína es separada de una segunda proteína en una mezcla que incluye a ambas proteínas en una mezcla cuando la mezcla es sometida a un proceso de tal manera que al menos la mayoría de las moléculas de la proteína sean removidas de esa porción de la mezcla que incluye al menos la mayoría de las moléculas de la segunda proteína.

Sustancialmente similar: Para los propósitos de la invención, las proteínas son sustancialmente similares si ellas son al menos 80%, preferiblemente al menos 90% idénticas entre sí en la secuencia de aminoácidos y mantienen o alteran en una forma deseable la actividad biológica de la proteína inalterada. Incluidos entre los aminoácidos considerados idénticos para el propósito de determinar si las proteínas son sustancialmente similares están los aminoácidos que son sustituciones conservadoras, que es muy poco probable que afecten la actividad biológica, incluidos los 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 estos cambios a la inversa. Ver, por ejemplo, Neurath y colaboradores, *The Proteins*, Academic Press, New York (1979). El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por medio de inspección visual y de cálculos matemáticos, o más preferiblemente, se hace la comparación comparando la información de la secuencia utilizando un programa de computador tal como el programa versión 10.0 del paquete Wisconsin del Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI), "GAP" (Devereux y colaboradores, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 387) u otros programas de computador comparables. Los parámetros preferidos predeterminados para el programa "GAP" incluyen: (1) la matriz ponderada de comparación de aminoácidos de Gribskov y Burgess ((1986), *Nucl. Acids Res.* 14: 6745), como lo describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358 (1979), u otras matrices de comparación comparables; (2) una penalización de 30 por cada vacío y una penalización de 1 por cada símbolo en cada vacío para las secuencias de aminoácidos; (3) no penalización para los vacíos en los extremos; y (4) no penalización máxima para vacíos largos. También se puede hacer uso de otros programas utilizados por aquellos capacitados en el arte de la comparación de secuencias.

TNFR: "TNFR" se refiere a proteínas compuestas de secuencias de aminoácidos que son idénticas o sustancialmente similares a la secuencia de un receptor nativo del factor de necrosis tumoral de mamífero (TNFR). La actividad biológica para el propósito de determinar similitud sustancial significa la capacidad para enlazar al factor de necrosis tumoral (TNF), para transducir una señal biológica iniciada por el enlazamiento de TNF a una célula, o para reaccionar en forma cruzada con anticuerpos anti-TNR surgidos contra TNFR de fuentes naturales (esto es, no recombinantes). Un TNFR puede ser cualquier TNFR de mamífero, incluidos los TNFR de humano o de murdo. Tales TNFR son descritos en la patente estadounidense No. 5.395.760, y en la patente estadounidense No. 5.610.279. Un TNFR particularmente preferido es aquel descrito en la patente estadounidense No. 5.395.760, que tiene un peso molecular aparente medido por SDS-PAGE de aproximadamente 80 kilodaltons en su forma glicosilada.

TNFR: F_C : TNFR: F_C es una proteína recombinante de fusión que incluye todo o parte de un dominio extracelular de un TNFR fusionado a una región F_C de un anticuerpo. Tal dominio extracelular incluye, pero no se limita a, secuencias de aminoácidos sustancialmente similares a los aminoácidos 1-163, 1-185, ó 1-235 de la Figura 2A de la patente estadounidense No. 5.395.760. Los usos posibles de TNFR: F_C purificado por medio de métodos convencionales se discuten en Srivastava (2001) *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 109 (1 &

2): 125-141; Strand (1999) Clinical Cornerstones Office Rheumatology 2 (2): 38-50; Hodge y colaboradores (1998) Immunology Letters 63: 49-51.

Dominio variable del anticuerpo inmunoglobulina: Un dominio variable del anticuerpo inmunoglobulina es un dominio de inmunoglobulina que es idéntico o sustancialmente similar a un dominio V_L o a un dominio V_H de origen humano o animal. Para los propósitos de la invención, la actividad biológica de un dominio variable del anticuerpo inmunoglobulina con el objeto de determinar una similitud sustancial es enlazamiento de antígeno.

Descripción del método

El proceso de purificación de una proteína a menudo involucra numerosas etapas. La presente invención abarca un proceso para reducir la cantidad de una segunda proteína en una mezcla que incluye una proteína que está siendo purificada y una segunda proteína, en donde la segunda proteína es introducida durante una etapa de cromatografía de afinidad en la cual la segunda proteína es parte del adsorbente. La remoción de tal segunda proteína puede ser desafiante cuando los puntos isoeléctricos de la proteína que está siendo purificada y un complejo de la segunda proteína con la proteína que está siendo purificada son cercanos debido a que la cromatografía de intercambio iónico es poco probable que afecte una separación de tales proteínas. El uso de hidroxapatita hace que la separación sea tanto posible como simple. Los métodos de la invención también tienen la ventaja adicional de remover otras materias indeseables de la proteína. Además, la invención incluye un método para purificar una proteína que comprende una región F_C de un anticuerpo utilizando cromatografía sobre hidroxapatita bajo condiciones en las cuales la proteína es recuperada en el flujo y lavado y al menos una proteína contaminante es retenida sobre la hidroxapatita.

En un aspecto, los métodos de la invención pueden reducir la cantidad de una segunda proteína, y/o un complejo de la segunda proteína con la proteína que está siendo purificada, que es introducida durante la cromatografía de afinidad, en una muestra que contiene la proteína que está siendo purificada. En este aspecto, la cromatografía sobre hidroxapatita se lleva a cabo bajo condiciones tales que la proteína que está siendo purificada no se enlace a la hidroxapatita, pero la segunda proteína, y/o un complejo de la segunda proteína con la proteína que está siendo purificada, se enlacen.

El proceso de la invención puede, en algunas modalidades, involucrar también al menos dos etapas. Primero, la proteína sufre una etapa previa de purificación por cromatografía de afinidad utilizando la segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente. Segundo, la cromatografía sobre hidroxapatita se lleva a cabo bajo condiciones tales que la proteína no se enlace a la hidroxapatita, pero la segunda proteína, y/o un complejo de la segunda proteína con la proteína que está siendo purificada, lo hagan. El proceso completo de purificación de la proteína puede incluir otras etapas antes y/o después de cada una de estas etapas.

Antes del equilibrio y de la cromatografía, se puede equilibrar previamente el medio para la cromatografía sobre hidroxapatita en una solución escogida, por ejemplo, una sal y/o una solución amortiguadora. La etapa de equilibrio previo sirve para desplazar una solución utilizada para regeneración y/o almacenamiento del medio de cromatografía. Alguien capacitado en el arte se dará cuenta que la composición de equilibrio previo depende de la composición de la solución de almacenamiento y de la solución que va a ser utilizada para la cromatografía posterior. De este modo, las soluciones apropiadas para equilibrio previo pueden incluir al mismo amortiguador o sal utilizados para llevar a cabo la cromatografía, opcionalmente, con una concentración mayor de la que es utilizada para llevar a cabo la cromatografía. Los amortiguadores y las sales que pueden ser utilizados para la cromatografía se discuten más adelante. Por ejemplo, cuando la solución utilizada para llevar a cabo la cromatografía incluye fosfato de sodio en una concentración dada, la etapa de equilibrio previo puede tener lugar en una solución que contiene fosfato de sodio a una concentración mayor. Como ilustración de esto, si la solución utilizada para llevar a cabo la cromatografía incluye fosfato de sodio aproximadamente entre 0,5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, la etapa de equilibrio previo puede presentarse en una solución que contiene fosfato de sodio en concentraciones aproximadamente entre 0,2 molar y aproximadamente 0,5 molar, más preferiblemente en concentraciones de fosfato de sodio aproximadamente entre 0,3 molar y aproximadamente 0,4 molar, inclusive.

Antes de aplicar la muestra a la columna, se puede equilibrar el medio para la cromatografía sobre hidroxapatita en el amortiguador o la sal que serán utilizados para la cromatografía de la proteína. Como se discute más adelante, se puede llevar a cabo la cromatografía (y la carga de la proteína que va a ser purificada) en una variedad de amortiguadores o de sales que incluyen sales de sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato, y/o citrato y/o amortiguador Tris. Tales amortiguadores o sales pueden tener un pH de al menos aproximadamente 5,5. En algunas modalidades, el equilibrio puede tener lugar en una solución que contiene un amortiguador Tris o de fosfato de sodio. Opcionalmente, el amortiguador de fosfato de sodio está en una concentración aproximadamente entre 0,5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, más preferiblemente en una concentración aproximadamente entre 15 milimolar y 35 milimolar. Preferiblemente, el equilibrio tiene lugar a un pH aproximadamente de al menos 5,5. El equilibrio tiene lugar a unos pH aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 8,6, preferiblemente a unos pH aproximadamente entre 6,5 y 7,5. Más preferiblemente, la solución incluye un amortiguador de fosfato de sodio en una concentración de aproximadamente 25 milimolar y a un pH de aproximadamente 6,8.

Cualquiera o todas las etapas cromatográficas de la invención se pueden llevar a cabo a través de cualquier medio mecánico. La cromatografía se puede realizar en una columna. La columna puede ser corrida con o sin presión y desde la parte superior hasta la inferior o desde la parte inferior hasta la superior. La dirección de flujo del fluido

en la columna se puede invertir durante el proceso cromatográfico. La cromatografía también se puede llevar a cabo utilizando un proceso por tandas en el cual se separa el soporte sólido del líquido utilizado para cargar, lavar, y eluir la muestra por medio de cualquier medio adecuado, incluida la gravedad, centrifugación, o filtración. La cromatografía también se puede llevar a cabo poniendo en contacto a la muestra con un filtro que adsorba o retenga algunas moléculas en la muestra más fuertemente que a otras.

La proteína puede ser producida por células huésped vivas que han sido genéticamente modificadas para producir la proteína. Los métodos para modificar genéticamente las células para producir proteínas son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Ausabel y colaboradores, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York). Tales métodos incluyen introducir ácidos nucleicos que codifican y permiten la expresión de la proteína dentro de células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células de hongos, o, preferiblemente, células animales desarrolladas en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Ejemplos de cepas adecuadas de *E. coli* incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que falle en escindir ADN foráneo. Las células huésped de hongos que pueden ser utilizadas incluyen, pero no se limitan a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Unos pocos ejemplos de líneas de células animales que pueden ser utilizadas son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, y WI38. Se pueden establecer nuevas líneas de células animales utilizando métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte (por ejemplo, por medio de transformación, de infección viral, y/o de selección). Opcionalmente, la proteína puede ser secretada por las células huésped dentro del medio.

La concentración de proteína de una muestra en cualquier etapa de purificación se puede determinar por medio de cualquier método adecuado. Tales métodos son bien conocidos en el arte e incluyen: 1) métodos colorimétricos tales como el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford, el ensayo de Smith, y el ensayo de oro coloidal; 2) métodos que utilizan las propiedades de absorción de radiación UV de las proteínas; y 3) estimación visual con base en las bandas coloreadas de proteína sobre geles que dependen de la comparación con estándares de proteína de cantidad conocida sobre el mismo gel. Ver, por ejemplo, Stoschek (1990), *Quantitation of Protein*, en *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymol.* 182: 50-68.

La proteína que experimenta purificación como se contempla por parte de la invención incluye uno o más dominios constantes del anticuerpo inmunoglobulina y puede, pero no necesariamente, incluir un dominio único o dominios múltiples variables del anticuerpo inmunoglobulina. Puede ser una proteína de ocurrencia natural o una proteína recombinante de fusión. Puede incluir una porción de F_C de un anticuerpo. Puede también incluir una proteína que no es un anticuerpo.

Algunas proteínas contempladas específicamente para uso con la invención incluyen proteínas recombinantes de fusión que incluyen uno o más dominios constantes del anticuerpo inmunoglobulina, opcionalmente una porción de F_C de un anticuerpo, y una proteína idéntica o sustancialmente similar a una de las siguientes proteínas: un ligando flt3 (como se describe en la solicitud internacional No. WO 94/28391), un ligando CD40 (como se describe en la patente estadounidense No. 6.087.329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, ligando Fas, ligando para el activador del receptor de NF-Kapa B (RANKL), ligando que induce apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, como se describe en la solicitud internacional No. WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, como se describe en la patente australiana No. 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, RANTES, hormona de crecimiento, insulina, insulintropina, factores de crecimiento tipo insulina, hormona paratiroidea, interferones, factores de crecimiento neural, glucagón, interleuquinas 1 a 18, factores de estimulación de colonias, linfotoxina β , factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, y diferentes ligandos para las moléculas de la superficie de la célula ELK y Hek (tal como los ligandos para las quinasas relacionadas con eph o LERKS). Las descripciones de las proteínas que se pueden purificar de acuerdo con los métodos de la invención se pueden encontrar, por ejemplo, en *Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research*, Vol. II (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); y *The Cytokine Handbook* (A.W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1991).

Las proteínas contempladas por la invención también incluyen proteínas recombinantes de fusión que incluyen uno o más dominios constantes del anticuerpo inmunoglobulina, opcionalmente una porción de F_C de un anticuerpo, más un receptor para cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas o proteínas sustancialmente similares a tales receptores. Estos receptores incluyen: ambas formas de TNFR (denominadas como p55 y p75), los receptores tipo I y II de la Interleuquina 1 (como se describe en la patente EP No. 0 460 846, la patente estadounidense No. 4.968.607, y la patente estadounidense No. 5.767.064), el receptor de Interleuquina 2, el receptor de Interleuquina 4 (como se describe en la patente EP No. 0 367 566 y la patente estadounidense No. 5.856.296), el receptor de Interleuquina 15, el receptor de Interleuquina 17, el receptor de Interleuquina 18, el receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, los receptores para oncostatina M y el factor inhibidor de leucemia, el activador del receptor de NF-Kapa B (RANK, como se describe en la patente estadounidense No. 6.271.349), los receptores para TRAIL (incluidos los receptores para TRAIL 1, 2, 3 y 4), y receptores que incluyen dominios de muerte, tales como Fas o el Receptor que Induce Apoptosis (AIR).

Otras proteínas que pueden ser purificadas utilizando el proceso e la invención incluyen antígenos de diferenciación (denominados como proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de éstas que están

fusionadas al menos a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, opcionalmente a una porción de F_C de un anticuerpo. Tales antígenos están divulgados en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani y colaboradores, eds., Kobe, Japan, 1996). Se describen proteínas CD similares en trabajos posteriores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen CD27, CD30, CD39, CD40, y los ligandos de los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia del receptor TNF, que también incluye al ligando 41BB y OX40. Los ligandos son a menudo miembros de la familia del TNF, como lo son el ligando 41BB y el ligando OX40. Por lo tanto, los miembros de las familias del TNF y del TNFR pueden ser purificados también utilizando la presente invención.

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también pueden ser purificados de acuerdo con la invención. Los ejemplos incluyen proteínas recombinantes de fusión que incluyen al menos un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina más todo o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estas: miembros de la familia de la metaloproteína con actividad de desintegrina, diferentes quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, Enzima Convertidora de TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas anteriormente mencionadas, y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

El método de la invención también puede ser utilizado para purificar anticuerpos o porciones de los mismos y anticuerpos quiméricos, esto es, anticuerpos que tienen dominios constantes del anticuerpo inmunoglobulina humana acoplados a uno o más dominios variables del anticuerpo inmunoglobulina de murido, o fragmentos de los mismos. El método de la invención también puede ser utilizado para purificar conjugados que incluyen un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Tales sustancias incluyen: derivados de la maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como una enterotoxina de *Estafilococo*); isótopos de yodo (tales como el yodo 125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como Cy5.5.18); y proteínas inactivadoras del ribosoma (tales como buganina, gelonina, o saporina-S6). Los ejemplos de anticuerpos o de conjugados de anticuerpo/citotoxina o anticuerpo/luminóforo contemplados por la invención incluyen a aquellos que reconocen a cualquiera o a una combinación de las proteínas anteriormente descritas y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-2, subunidades de receptor de IL-4, del receptor de IL-6, del receptor de IL-13, del receptor de IL-18, PDGF- β , VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, receptor de EGF, receptor de VEGF, complemento de C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asocio con cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína asociada con el tumor TAG-72, el antígeno SK-1, los epítomos asociados con el tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos asociados con el cáncer o proteínas expresadas sobre células cancerosas de seno, de colon, células escamosas, células cancerosas de próstata, de pulmón y/o de riñón y/o sobre células de melanoma, de glioma, o de neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, las integrinas B2, los receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, el ligando RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, la molécula de adhesión de la célula epitelial (EpCAM), la molécula-3 de adhesión intercelular (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor tisular VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), fetoproteína alfa (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado con el linfocito T citotóxico), el receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina, IFN- γ , Virus Sincitial Respiratorio, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (HBV), mutantes de *Streptococo*, y *Staphylococcus aureus*.

La invención puede ser utilizada también para purificar anticuerpos anti-idiotípicos, o proteínas sustancialmente similares, incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos anti-idiotípicos contra: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp 72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; o un anticuerpo contra el gangliósido GD2.

En cromatografía de afinidad, un adsorbente puede incluir un soporte sólido adecuado con una segunda proteína fijada a él. Una muestra de proteína que contiene la proteína que va a ser purificada puede ser aplicada a este adsorbente. El adsorbente puede ser posteriormente lavado en una solución que no interfiera con el enlazamiento de la segunda proteína al dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina de la proteína. La proteína por lo tanto puede ser eluida del adsorbente con una solución que interfiera con el enlazamiento del dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina por medio de la segunda proteína.

La segunda proteína es cualquier proteína que puede enlazarse a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, que puede, pero no necesariamente, ser una proteína recombinante de fusión. Opcionalmente, la segunda proteína puede ser Proteína G, Proteína LG o Proteína A. la segunda proteína puede estar fijada a cualquier soporte sólido adecuado incluyendo: agarosa, sefarosa, sílice, carbón vegetal de colodión, arena, y cualquier otro material adecuado. Tales materiales son bien conocidos en el arte. Se puede utilizar cualquier método adecuado para fijar la segunda proteína al soporte sólido. Los métodos para fijar proteínas a soportes sólidos adecuados son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Ostrove (1990) en *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology* 182: 357-371. Además, tales soportes sólidos que ya tienen la segunda proteína fijada se encuentran comercialmente disponibles por parte de muchos fabricantes incluidos BioRad, Merck, Amersham Pharmacia Biotech, y Millipore Corporation.

En una etapa opcional, se carga una muestra de proteína que incluye a la muestra que va a ser purificada más los contaminantes sobre el adsorbente, que incluye a la segunda proteína fijada a un soporte sólido, en una solución que contiene un amortiguador y/o una sal. Los amortiguadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, amortiguadores de

fosfato, amortiguadores Tris, amortiguadores de acetato, y/o amortiguadores de citrato. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, sales de calcio, y/o sales de magnesio. Por ejemplo, la solución puede incluir Tris en concentraciones aproximadamente entre 5 milimolar y 100 milimolar y cloruro de sodio en concentraciones aproximadamente entre 50 milimolar y 250 milimolar. Sin embargo, se pueden utilizar otros amortiguadores y sales. Después de la carga, se puede lavar el adsorbente con más de la misma solución. La proteína puede ser eluida utilizando una solución que interfiere con el enlazamiento de la segunda proteína al dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina. Esta solución puede incluir un agente caotrópico, tal como guanidinio, un agente que puede o bien incrementar o disminuir el pH, y/o una sal. Esta solución puede incluir ácido acético, glicina, o ácido cítrico. La elución se puede efectuar disminuyendo el pH. Por ejemplo, el pH se puede disminuir aproximadamente hasta 4,5 o menos, típicamente aproximadamente entre 3,3 y aproximadamente 4,0, utilizando una solución que contiene citrato o acetato, entre otras posibilidades. Alternativamente, el pH se puede incrementar, típicamente aproximadamente hasta 8,5. Las soluciones apropiadas para efectuar tales eluciones pueden incluir Tris o carbonato de sodio, entre otras posibilidades. También se encuentran disponibles otros métodos de elución. Los protocolos para tal cromatografía de afinidad son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Miller y Stone (1978), *J. Immunol. Methods* 24 (1-2): 111-125. Las condiciones para enlazamiento y elución las pueden optimizar fácilmente aquellos capacitados en el arte.

En los métodos de la invención, la proteína es sometida a cromatografía sobre hidroxiapatita bajo condiciones en las cuales la proteína no se enlaza a la hidroxiapatita, pero lo hace la segunda proteína, y/o un complejo de la segunda proteína con la proteína, que puede estar presente después de la cromatografía de afinidad. La muestra es cargada sobre hidroxiapatita y se realiza la cromatografía en una solución que contiene un amortiguador y/o una sal a un pH aproximadamente superior a 5,5. Preferiblemente, puede efectuarse la cromatografía en una solución que es igual o similar a aquella en la cual se carga la proteína sobre el medio de cromatografía. La cromatografía sobre hidroxiapatita puede llevarse a cabo bajo condiciones en las cuales la proteína y la segunda proteína se enlazan entre sí para formar un complejo o bajo condiciones en las cuales no lo hacen. De este modo, en el primer caso, la separación de la proteína de la segunda proteína puede implicar la separación de la proteína de un complejo de la segunda proteína con la proteína. En el segundo caso, la separación de la proteína de la segunda proteína puede implicar precisamente eso. La cromatografía y la carga pueden realizarse en una variedad de amortiguadores y/o de sales incluidos amortiguadores de sodio, de potasio, de amonio, de magnesio, de calcio, de cloruro, de fluoruro, de acetato, de fosfato, de citrato y/o de Tris. Los ejemplos específicos de tales amortiguadores y sales son: Tris, fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de amonio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de amonio, fluoruro de calcio, fluoruro de magnesio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, acetato de magnesio, acetato de calcio, acetato de sodio, acetato de potasio, o acetato de amonio. El rango de pH se escoge para optimizar las condiciones de la cromatografía y para retener las características deseadas de la proteína de interés. Para la mayoría de las proteínas de interés, que pueden estar en el rango aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 8,6, preferiblemente aproximadamente entre 6,5 y aproximadamente 7,5. Sin embargo, se sabe que ciertas proteínas son resistentes a unos pH extremos, y puede ser posible un rango más amplio. En una modalidad, la solución de carga/cromatografía incluye un amortiguador de fosfato de sodio en una concentración aproximadamente entre 0,5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, más preferiblemente en una concentración aproximadamente entre 15 milimolar y 35 milimolar de fosfato de sodio. Opcionalmente, la solución incluye un amortiguador de fosfato de sodio en una concentración aproximadamente de 25 milimolar y un pH aproximadamente de 6,8. En otra modalidad, la solución de carga incluye Tris a un pH aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 9,0, preferiblemente aproximadamente entre 6,5 y aproximadamente 8,0.

Se recolecta el líquido del fluido, que incluye a la proteína que está siendo purificada. El amortiguador seleccionado y/o la sal a la concentración seleccionada permiten que la segunda proteína se enlace a la hidroxiapatita, mientras que la proteína que está siendo purificada no lo hace. Una persona capacitada en el arte se guiará por el conocimiento del estado del arte para determinar qué amortiguador o qué sal es apropiada para la proteína particular que está siendo purificada. Ver, por ejemplo, Gorbunoff (1990), *Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns*, en *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology* 182: 329-339; Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third Edition, pp. 173-75, Springer, 1994. Además, alguien capacitado en el arte puede determinar fácilmente la concentración óptima del amortiguador o la sal seleccionados a utilizar, por ejemplo, corriendo a un gradiente del amortiguador o de la sal seleccionados a través de la columna de hidroxiapatita a la cual se aplica una muestra que incluye a la proteína que va a ser purificada y la segunda proteína. Las fracciones del efluente de la columna se pueden recolectar y analizar para determinar la concentración de amortiguador o de sal a la cual eluyen la proteína y la segunda proteína. Los análisis adecuados incluyen, por ejemplo, una medición de la conductancia eléctrica con un medidor de conductividad (para determinar la concentración de sal en la muestra) más electroforesis en gel o un ensayo de ELISA (para determinar la identidad de las proteínas en la muestra). Opcionalmente, se puede lavar la hidroxiapatita con más de la misma solución en la cual se cargó la muestra de proteína, y se puede recolectar también esta solución de lavado y combinarla con el líquido del fluido.

Después de la recolección del fluido y, opcionalmente, del lavado, que incluyen a la proteína que está siendo purificada, se pueden liberar las proteínas que pueden permanecer enlazada a la hidroxiapatita despojando al medio de cromatografía utilizando una solución que contiene al amortiguador o a la sal utilizados para la cromatografía, pero con una molaridad más alta. Luego, se puede regenerar la columna utilizando una solución que tendrá el efecto de liberar la mayor parte o todas las proteínas del medio cromatográfico y reduciendo o eliminando cualquier contaminación microbiana que pueda estar presente en el medio cromatográfico. En una modalidad, tal solución puede incluir

hidróxido de sodio. Se puede utilizar también otros reactivos. Posteriormente, se puede enjuagar la columna y almacenarla en una solución que pueda desestimular el crecimiento microbiano. Tal solución puede contener hidróxido de sodio, pero también pueden ser apropiados otros reactivos.

5 La segunda proteína, un complejo de la proteína y la segunda proteína, y/o otras proteínas que pueden estar presentes en una muestra de la proteína que está siendo purificada, pueden ser monitoreados por medio de cualquier medio apropiado. Preferiblemente, la técnica debe ser lo suficientemente sensible para detectar contaminantes en el rango aproximadamente entre 2 partes por millón (ppm) (calculado como nanogramos por miligramo de la proteína que está siendo purificada) y 500 ppm. Por ejemplo, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un
10 método bien conocido en el arte, puede ser utilizado para detectar contaminación de la proteína por la segunda proteína. Ver, por ejemplo, Reen (1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), en Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32: 461-466. En un aspecto, puede que la cromatografía sobre hidroxiapatita no reduzca la contaminación en forma detectable por parte de una segunda proteína, especialmente si el material cargado sobre la hidroxiapatita tiene niveles de la segunda proteína que son cercanos o están por debajo de los niveles detectables. Alternativamente, la cromatografía sobre hidroxiapatita puede reducir la contaminación por parte de una
15 segunda proteína aproximadamente al menos dos veces, preferiblemente aproximadamente al menos tres veces, más preferiblemente aproximadamente al menos cinco veces, aún más preferiblemente aproximadamente al menos diez veces, incluso más preferiblemente aproximadamente al menos quince veces, lo más preferible aproximadamente al menos veinte veces. Preferiblemente, la contaminación de la proteína por parte de la segunda proteína después de la cromatografía sobre hidroxiapatita no es aproximadamente mayor a 400 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 360 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 320 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 280 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 240 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 200 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 160 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 140 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 120
20 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 100 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 80 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 60 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 40 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 20 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 10 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 5 ppm, más preferiblemente no es aproximadamente mayor a 1 ppm y lo más preferible no es aproximadamente mayor a 0,5 ppm. La contaminación por parte de dicha segunda proteína puede estar en el rango desde niveles indetectables hasta aproximadamente 5 ppm o aproximadamente desde 5 ppm hasta aproximadamente 400 ppm. Si se está purificando una proteína para uso farmacológico, alguien capacitado en el arte se dará cuenta de que el nivel preferido de la segunda proteína puede depender de la dosis semanal de la proteína que se va a administrar por paciente, con el objetivo de que el paciente no reciba más allá de una cierta cantidad de una proteína contaminante por semana. De este modo, si se disminuye la
25 dosis semanal requerida de la proteína, se puede incrementar posiblemente en nivel de contaminación por parte de una segunda proteína.

En forma similar, otras proteínas contaminantes, incluidas las proteínas de la célula huésped, que pueden estar presentes en una muestra de la proteína que está siendo purificada, pueden ser monitoreadas por cualquier medio apropiado, incluyendo el ensayo de ELISA. En un aspecto, la contaminación de la proteína por parte de esas otras proteínas se puede reducir después de la cromatografía sobre hidroxiapatita, preferiblemente aproximadamente al menos dos veces, más preferiblemente aproximadamente al menos tres veces, más preferiblemente aproximadamente al menos cinco veces, más preferiblemente aproximadamente al menos diez veces, más preferiblemente aproximadamente al menos veinte veces, más preferiblemente aproximadamente al menos treinta veces, más preferiblemente aproximadamente al menos cuarenta veces, más preferiblemente aproximadamente al menos cincuenta veces, más preferiblemente aproximadamente al menos sesenta veces, más preferiblemente aproximadamente al menos setenta veces, más preferiblemente aproximadamente al menos 80 veces, más preferiblemente aproximadamente al menos 90 veces, y lo más preferible aproximadamente al menos 100 veces. En otro aspecto, la contaminación de la proteína por parte de esas otras proteínas después de cromatografía sobre hidroxiapatita no es aproximadamente superior a 10.000 ppm, preferiblemente no aproximadamente superior a 2.500 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 400 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 360 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 320 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 280 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 200 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 160 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 140 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 120 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 100 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 80 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 60 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 40 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 30 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 20 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 10 ppm, más preferiblemente no aproximadamente superior a 5 ppm. Tal contaminación puede estar en el rango desde niveles no detectables hasta aproximadamente 10 ppm o aproximadamente desde 10 ppm hasta aproximadamente 10.000 ppm. Si se está purificando una proteína para uso farmacológico, alguien capacitado en el arte se dará cuenta de que el nivel aceptable de otras proteínas contaminantes puede depender de la dosis semanal de la proteína que se va a administrar por paciente, como se explicó anteriormente.

65 La cantidad de ADN que puede estar presente en una muestra de la proteína que está siendo purificada se puede determinar por medio de cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo que utilice reacción en cadena de la polimerasa. Opcionalmente, la técnica puede detectar contaminación con ADN en niveles de 10 picogramos por miligramo de proteína y superiores. Los niveles de ADN se pueden reducir por medio de cromatografía

ES 2 322 945 T3

sobre hidroxiapatita, opcionalmente aproximadamente dos veces, preferiblemente aproximadamente cinco veces, más preferiblemente aproximadamente diez veces, más preferiblemente aproximadamente quince veces, lo más preferible aproximadamente 20 veces. Opcionalmente, los niveles de ADN después de la cromatografía sobre hidroxiapatita son aproximadamente menores a 20 picogramos por miligramo de proteína, preferiblemente menores a 15 picogramos por miligramo de proteína, más preferiblemente menores a 10 picogramos por miligramo de proteína, los más preferible menos de 5 picogramos por miligramo de proteína.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a manera de ilustración y no como una limitante.

10 Ejemplo 1

Reducción en los Niveles de Proteína A en una Muestra que Contiene TNFR: F_C Utilizando Cromatografía sobre Hidroxiapatita

15 Este experimento demuestra que la cromatografía sobre hidroxiapatita puede reducir los niveles de proteína A residual en una muestra de proteína que incluye TNFR: F_C que contiene una cantidad definida de proteína A, que puede formar un complejo con TNFR: F_C.

Se equilibró previamente una columna de hidroxiapatita cerámica (Tipo II, BioRad, 80 μ) de 18 centímetros de alto y 1,6 centímetros de diámetro interno con dos volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,4 molar, pH 6,8 y equilibrada con cuatro volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8, que tiene una conductividad de 2,8 miliSiemens (mS). Se cargó una muestra de proteína (5,11 miligramos/mililitro) en 668 mililitros de fosfato de sodio 25 mM, pH 6,8 que contiene TNFR: F_C y proteína A (209 ppm) sobre la columna. Se determinó la cantidad de proteína A en la muestra utilizando un ensayo de ELISA. Se recolectó el líquido del fluido, que contenía TNFR: F_C. Se lavó la columna con tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8, y se recolectó el lavado y se lo combino con el flujo. La proteína recolecta en el flujo y en lavado se esterilizó por medio de filtración y se almacenó a 2-8°C hasta que se llevó a cabo la siguiente etapa de purificación. La mayor parte del TNFR: F_C cargado se recupera (97%) en el líquido de fluido más el de lavado. Se midió la cantidad de proteína A en el fluido más en el lavado, y era de 11 ppm. Después de eso, se despojo la columna utilizando tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,4 molar, pH 6,8, se la regeneró utilizando dos volúmenes de columna de hidróxido de sodio 1 molar, y se enjuagó con tres volúmenes de columna de hidróxido de sodio 0,1 molar, fosfato de sodio 10 milimolar, y se almacenó en la misma solución, en cuya condición quedó lista para ser reutilizada.

Ejemplo 2

Reducción en los Niveles de Proteínas de la Célula Huésped en una Muestra que Contiene TNFR: F_C Utilizando Cromatografía sobre Hidroxiapatita

Este experimento demuestra que los niveles de proteínas de la célula huésped en una muestra que contiene TNFR: F_C se puede reducir por medio de cromatografía sobre hidroxiapatita.

Se equilibró previamente una columna de hidroxiapatita cerámica (Tipo II, BioRad, 80 μ) de 10 centímetros de alto y 1,1 centímetros de diámetro interno con dos volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,3 molar, pH 6,8 y equilibrada con tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8, que tiene una conductividad de 2,8 mS. Se cargaron aproximadamente 1,9 gramos de proteína en un volumen de 382 mililitros de fosfato de sodio 25 mM, pH 6,8 sobre la columna. La muestra incluía TNFR: F_C que contenía la gran mayoría de la muestra, y las proteínas de la célula huésped (545 ppm). Se determinó la cantidad de proteínas de la célula huésped en la muestra utilizando ensayos de ELISA. Se recolectó el líquido del fluido, que contenía TNFR: F_C. Se lavó la columna con tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8, y se recolectó el lavado y se lo combino con el flujo. La mayor parte del TNFR: F_C cargado se recuperó (92%) en el líquido de fluido más el de lavado. Se esterilizó el TNFR: F_C recolectado por medio de filtración. La cantidad de proteínas de la célula huésped se disminuyó aproximadamente al menos setenta veces (desde 545 ppm hasta 7 ppm) cuando se la compara con el material cargado sobre la columna de hidroxiapatita. Después de eso, se despojo la columna utilizando tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,3 molar, pH 6,8, se enjuagó con medio volumen de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8 regenerada utilizando dos volúmenes de columna de hidróxido de sodio 1 molar, enjuagada con tres volúmenes de columna de hidróxido de sodio 0,1 molar, fosfato de sodio 10 milimolar, y se almacenó en la misma solución, en cuya condición quedó lista para ser reutilizada.

La Figura 1 muestra los perfiles de absorbancia y de conductividad de la columna. La mayor parte de la proteína en la muestra fluye a través de la columna antes del incremento de la conductividad (aproximadamente hasta 20 mS) provocado por la adición de fosfato de sodio 0,3 molar, aproximadamente entre 55 y 59 volúmenes de columna. El gran incremento en la conductancia (aproximadamente hasta 200 mS) después de eso corresponde a la adición de hidróxido de sodio 1,0 molar para regenerar la columna como se explicó anteriormente. Ya que el TNFR: F_C constituye la especie mayoritaria en la muestra de proteína cargada sobre la columna, este perfil indica que TNFR: F_C fluye a través de una columna de hidroxiapatita que corre en fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8.

Ejemplo 3

Reducción en la Proteína A Residual y de Otras Proteínas en una Muestra de TNFR: F_C por Medio de Cromatografía sobre Hidroxiapatita Cerámica

5

El siguiente experimento muestra que los niveles de proteína A y de otras proteínas contaminantes pueden ser reducidos simultáneamente utilizando cromatografía sobre hidroxiapatita.

Se equilibró previamente una columna de hidroxiapatita cerámica (Tipo II, BioRad, 80 μ) de 18 centímetros de alto y 1,6 centímetros de diámetro interno con dos volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,4 molar, pH 6,8 y equilibrada con tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8. Se cargaron aproximadamente 3,2 gramos de proteína con una concentración aproximada de 5 mg/ml en fosfato de sodio 25 milimolar, que contiene TNFR: F_C, Proteína A, que forma un complejo con TNFR: F_C bajo estas condiciones, (aproximadamente entre 97 ppm y aproximadamente 106 ppm), y otras impurezas relacionadas con el proceso (PRI; aproximadamente entre 59 ppm y aproximadamente 67 ppm) sobre la columna. Se determinaron las cantidades de Proteína A y de PRI en la muestra utilizando ensayos de ELISA. Se recolectó el líquido del fluido, que contenía TNFR: F_C. Se lavó la columna con tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 25 milimolar, pH 6,8, y luego se recolectó el lavado. Casi todo el TNFR: F_C cargado (99-100%) fue recuperado en el líquido del fluido más el de lavado. Se redujo la cantidad de Proteína A y de PRI en la muestra en 5,3-5,4 veces y 2,8-3,7 veces, respectivamente, cuando se la compara con el material cargado sobre la columna de hidroxiapatita. Después de eso, se despojó la columna utilizando cinco volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,4 molar, pH 6,8, regenerada utilizando dos volúmenes de columna de hidróxido de sodio 1 M, enjuagada en tres volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8, hidróxido de sodio 0,1 M, y almacenada en la misma solución en cuya condición está lista para ser reutilizada.

La presente invención no está limitada en su alcance por las modalidades específicas descritas aquí, que se utilizan como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los métodos funcionalmente equivalentes y los componentes están dentro del alcance de la invención. En realidad, serán evidentes diferentes modificaciones de la invención además de aquellas descritas aquí, para aquellos capacitados en el arte relacionada con la descripción anterior y los dibujos acompañantes. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

30

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

35

Documentos de patente citados en la descripción

40

- US 60343363 B [0001]
- WO 9701633 A [0050]
- US 60347189 B [0001]
- AU 588819 [0050]
- US 60364272 B [0001]
- EP 0460846 A [0051]
- DE 4205938 [0003]
- US 4968607 A [0051]
- US 5395760 A [0038] [0038] [0039]
- US 5767064 A [0051]
- US 5610279 A [0038]
- EP 0367566 A [0051]
- WO 9428391 A [0050]
- US 5856296 A [0051]
- US 6087329 A [0050]
- US 6271349 B [0051]

45

50

55

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- R. VOLA y colaboradores, *Cell Biophys.*, 1994, vol. 24-25, 27-36 [0003]
- AYBAY; IMIR. *J. Immunol. Methods*, vol. 233 (1-2), 77-81 [0003]
- FORD y colaboradores, *J. Chromatogr. B*, 2001, vol. 754, 427-435 [0003]
- BENSINGER y colaboradores, *J. Biol. Response Modif.*, 1984, vol. 3, 347-351 [0004]
- VENTURA y colaboradores, *Cancer Treat. Rep.*, 1987, vol. 71 (4), 411-413 [0004]

60

65

ES 2 322 945 T3

- **TARDITI** y colaboradores, *J. Chromatography*, 1992, vol. 599, 13-20 [0005]
- **FORD** y colaboradores, *J. Chromatography B*, 2001, vol. 754, 427-435 [0005]
- 5 • Guide to Protein Purification. **OSTROVE**. *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 182, 357-379 [0020]
 - Immunoglobulins: Structure and Function. CHARLES A **HASEMANN**; J. DONALD **CAPRA**. *Fundamental Immunology*. 1989, vol. 209, 210-218 [0023]
- 10 • Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns, in Guide to Protein Purification. MARINA J. **GORBUNOFF**. *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 182, 329-339 [0027]
 - **PROTEIN L**; G. **VOLA** y colaboradores, *Cell. Biophys*, 1994, vol. 24-25, 27-36 [0033]
- 15 • **NEURATH** y colaboradores, *The Proteins. Academic Press*, 1979 [0037]
 - **DEVEREUX** y colaboradores, *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0037]
 - **GRIBSKOV**; BURGESS. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 6745 [0037]
- 20 • Atlas of Polypeptide Sequence and Structure. *National Biomedical Research Foundation*, 1979, 353-358 [0037]
 - **SRIVASTAVA**. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 2001, vol. 109 (1 & 2), 125-141 [0039]
- 25 • **STRAND**. *Clinical Cornerstones Office Rheumatology*, 1999, vol. 2 (2), 38-50 [0039]
 - **HODGE** y colaboradores, *Immunology Letters*, 1998, vol. 63, 49-51 [0039]
- 30 • *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, 1990 [0047]
 - Quantitation of Protein. **STOSCHEK**. Guide to Protein Purification, *Methods in Enzymol.* 1990, vol. 182, 50-68 [0048]
- 35 • Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. *Blackwell Sciences*, 1998, vol. II [0050]
 - Growth Factors: A Practical Approach. *Oxford University Press Inc*, 1993 [0050]
 - The Cytokine Handbook. *Academic Press*, 1991 [0050]
- 40 • Proceedings of the VIth International Workshop and Conference. *Leukocyte Typing VI*. 1996 [0052]
 - **OSTROVE**. Guide to Protein Purification, *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 182, 357-371 [0057]
- 45 • **MILLER**; **STONE**. *J. Immunol. Methods*, 1978, vol. 24 (1-2), 111-125 [0058]
 - Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns. **GORBUNOFF**. Guide to Protein Purification, *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 182, 329-339 [0060]
- 50 • **SCOPES**. Protein Purification: Principles and Practice. *Springer*, 1994, 173-75 [0060]
 - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **REEN**. Basic Protein and Peptide Protocols, *Methods Mol. Biol.* 1994, vol. 32, 461-466 [0062]

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para purificar una proteína de una muestra que incluye a la proteína y al menos una proteína contaminante que comprende someter la muestra a cromatografía sobre hidroxiapatita, por medio de la cual se separa la proteína de al menos una proteína contaminante, en donde la mayoría de las moléculas de la proteína se recuperan en el flujo y lavado, en donde la proteína ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente, en donde la segunda proteína se enlaza específicamente a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, y en donde la proteína incluye un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina.
- 10 2. Un método para purificar una proteína que comprende:
- 15 (a) someter la proteína y al menos una proteína contaminante a cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente, en donde la segunda proteína se enlaza específicamente a un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina y en donde la proteína incluye un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina al cual se enlaza específicamente la segunda proteína; y
- 20 (b) someter luego la proteína y al menos una proteína contaminante a cromatografía sobre hidroxiapatita en donde la mayoría de las moléculas de la proteína se recupera en el flujo y lavado, por medio de lo cual se separa la proteína de al menos una proteína contaminante.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la segunda proteína está presente en un nivel detectable en la muestra y en donde la proteína se separa de la segunda proteína por medio de la cromatografía sobre hidroxiapatita.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde la proteína ha sido secretada dentro de un medio de cultivo por células animales cultivadas.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en donde las células animales son células CHO.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la proteína incluye una porción de F_C de un anticuerpo.
- 45 7. El método de la reivindicación 6, en donde la proteína es TNFR: F_C o un anticuerpo.
- 50 8. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la segunda proteína es seleccionada del grupo que consiste de Proteína A y Proteína G.
- 55 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la cromatografía sobre hidroxiapatita se lleva a cabo en una solución que contiene fosfato de sodio en una concentración aproximadamente entre 5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar y que tiene un pH aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 8,6.
- 60 10. Un método para purificar una proteína recombinante de fusión a partir de una muestra que contiene a la proteína recombinante de fusión y al menos una proteína contaminante que comprende someter a la muestra a cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde la proteína recombinante de fusión incluye una porción de F_C de un anticuerpo y una proteína que no es de un anticuerpo, en donde la proteína recombinante de fusión ha sido previamente purificada por medio de cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente, y en donde la mayoría de las moléculas de la proteína recombinante de fusión se recuperan en el flujo y lavado.
- 65 11. Un método para purificar una proteína recombinante de fusión que comprende someter a la proteína recombinante de fusión y al menos una proteína contaminante a cromatografía de afinidad utilizando una segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente antes de someter a la proteína recombinante de fusión y al menos una proteína contaminante a cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde la mayoría de las moléculas de la proteína recombinante de fusión se recuperan en el flujo y lavado y en donde la proteína recombinante de fusión incluye una porción de F_C de un anticuerpo y una proteína que no es de un anticuerpo.
- 70 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde la mayoría de las moléculas de la proteína recombinante de fusión se recuperan de la hidroxiapatita en el flujo y lavado.
- 75 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la proteína recombinante de fusión es TNFR: F_C .
- 80 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde la segunda proteína es seleccionada del grupo que consiste de Proteína A y de Proteína G.
- 85 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde la cromatografía sobre hidroxiapatita se lleva a cabo en una solución que contiene fosfato de sodio en una concentración aproximadamente entre 5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar y que tiene un pH aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 8,6.

ES 2 322 945 T3

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en donde la proteína recombinante de fusión ha sido secretada dentro de un medio de cultivo por medio de células animales cultivadas.

17. El método de la reivindicación 16, en donde las células animales son células CHO.

18. Un método para purificar TNFR: F_C que comprende someter una muestra que contiene TNFR: F_C y al menos una proteína contaminante a cromatografía sobre hidroxiapatita bajo ciertas condiciones en donde la mayoría de las moléculas de TNFR: F_C son recuperadas en el flujo y lavado, en donde al menos una proteína contaminante es separada de TNFR: F_C.

19. Un método para separar una proteína de las proteínas de la célula huésped que comprende someter a una muestra que contiene a la proteína y al menos una proteína de la célula huésped a cromatografía sobre hidroxiapatita, en donde al menos una proteína de la célula huésped es separada de la proteína, en donde la proteína incluye un dominio constante del anticuerpo inmunoglobulina, en donde la mayoría de las moléculas de la proteína son recuperadas en el flujo y lavado, y en donde tanto la proteína como la proteína de la célula huésped han sido secretadas dentro de un medio de cultivo por medio de las células animales cultivadas.

20. El método de la reivindicación 19, en donde la concentración de las proteínas de la célula huésped con relación a la proteína en el flujo y lavado es aproximadamente menor a 100 partes por millón.

21. El método de la reivindicación 19 ó 20, en donde la proteína es TNFR: F_C.

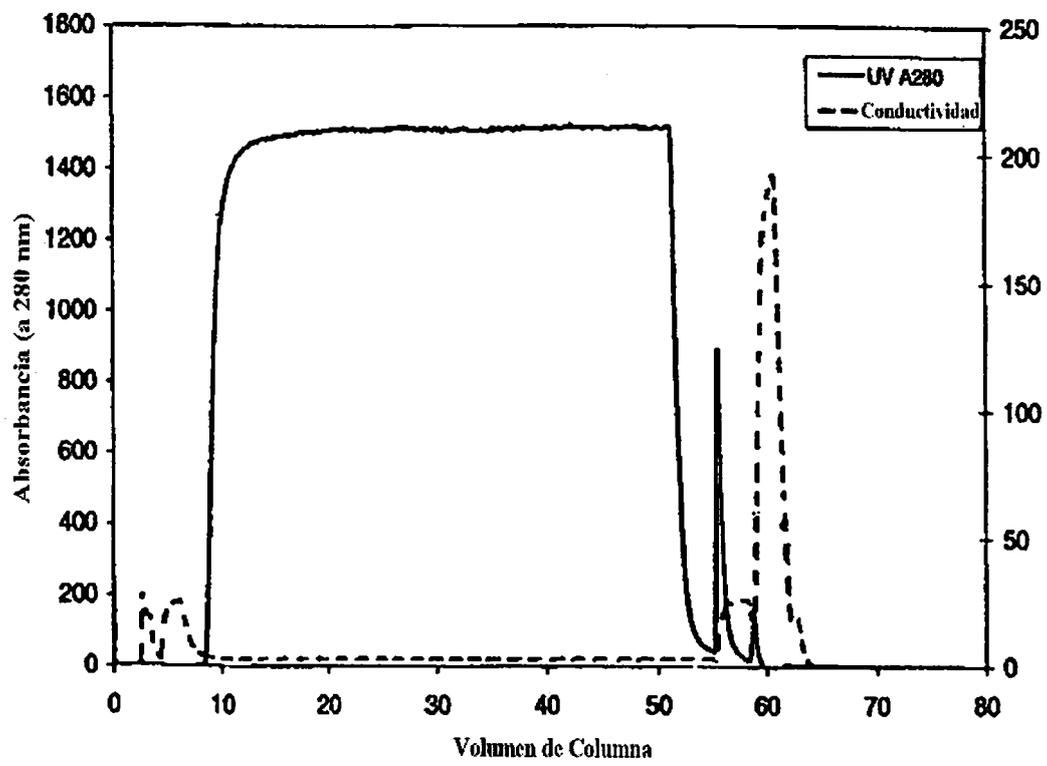


Figura 1