

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 804**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2006 E 06749952 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2013225**

54 Título: **Purificación de proteínas con tensioactivo catiónico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2015

73 Titular/es:

**CREALTA PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
150 S Saunders Rd., Suite 130
Lake Forest, IL 60045, US**

72 Inventor/es:

**FISCHER, MEIR y
HAROSH, ELIYAHU**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 532 804 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

Purificación de proteínas con tensioactivo catiónico

Campo de invención

La invención se refiere al campo de la purificación de proteínas usando tensioactivos.

5 Antecedentes

La producción de macromoléculas biológicas, particularmente proteínas, a menudo implica etapas de potenciación de la pureza basadas en propiedades físicas y fisicoquímicas. Las dificultades encontradas en tales etapas de procedimiento incluyen, pero no se limitan a, determinar las condiciones que permiten la separación de moléculas solubles e insolubles, la recuperación relativamente baja de la molécula deseada tras una etapa de tratamiento, la pérdida de actividad biológica en el transcurso del procedimiento y la sensibilidad de la proteína a las condiciones de las etapas del procedimiento tales como el pH.

Se han utilizado tensioactivos en el procesamiento de macromoléculas biológicas. Los tensioactivos catiónicos son una subclase reconocida de tensioactivos e incluyen compuestos de amonio anfipáticos. Los compuestos de amonio anfipáticos comprenden compuestos de amonio cuaternario de fórmula general QN^+ y compuestos de amonio primario con cadena de parafina de fórmula general RNH_3^+ . Ambos tipos de compuestos de amonio anfipáticos incluyen tensioactivos de amonio de cadena larga que tienen una cadena alifática larga de preferiblemente al menos seis átomos de carbono (Scott (1960) *Methods Biochem. Anal.* 8:145-197).

Se sabe que los tensioactivos de amonio cuaternario de cadena larga interactúan con macromoléculas biológicas. Los compuestos de amonio cuaternario de cadena larga tienen al menos un sustituyente en el nitrógeno que consiste en una cadena de alquilo lineal con 6-20 átomos de carbono. Los representantes mejor conocidos de esta clase son las sales de benzalconio (cloruros y bromuros), cloruro de hexadecilpiridinio, acetato de decualinio, bromuro de cetildimetilamonio (CTAB) y cloruro de hexadecilpiridinio (CPC1) y cloruro de bencetonio. Los tensioactivos de amonio cuaternario incluyen sales tales como sales de cetilpiridinio, por ejemplo cloruro de cetilpiridinio (CPC), sales de estearamida-metilpiridinio, sales de laurilpiridinio, sales de cetilquinolinio, sales de éster metílico del ácido laurilaminopropiónico, sales metálicas del ácido laurilaminopropiónico, lauril dimetil betaína, estearil dimetil betaína, lauril dihidroxietyl betaína y sales de bencetonio. Las sales de alquilpiridinio comprenden sales de estearil-trimetilamonio, cloruro de alquil-dimetilbencil-amonio y cloruro de dicloro-bencil-dimetil-alquilamonio.

Los usos conocidos de tensioactivos catiónicos para purificar macromoléculas biológicas incluyen 1) solubilización de agregados, incluyendo agregados de proteínas; 2) elución de macromoléculas biológicas unidas a columna cromatográfica; y 3) precipitación de polianiones tales como ácido hialurónico (HA), ácidos nucleicos y heparina (y moléculas que coprecipitan con polianiones).

Se han usado tensioactivos catiónicos para solubilizar agregados de proteínas. Otta y Bertini ((1975) *Acta Physiol. Latinoam.* 25:451-457, demostraron que podía solubilizarse uricasa activa a partir de peroxisomas de hígado de roedor con el tensioactivo de amonio cuaternario Hyamine 2389. Se encontró que el aumento de la concentración del tensioactivo de amonio daba como resultado el aumento de la disolución tanto de uricasa (basándose en la actividad enzimática) como de proteína total de manera que no hay aumento en la cantidad relativa de proteína uricasa con respecto a la cantidad de proteína total. En otras palabras, no hubo solubilización selectiva de la proteína uricasa con respecto a la proteína total, y la proteína uricasa no constituyó un porcentaje superior de la proteína total tras la solubilización con el tensioactivo catiónico. Por tanto, en este procedimiento, la pureza de la uricasa con respecto al contenido en proteína total aparentemente no se potencia como resultado de la solubilización con tensioactivo de amonio cuaternario.

En otro estudio, Truscoe ((1967) *Enzymologia* 33:1 19-32, examinó un panel de detergentes catiónicos, aniónicos y neutros para determinar su eficacia de extracción de urato oxidasa (uricasa) a partir de polvos de riñón de buey. Aunque se encontró que los detergentes neutros y aniónicos potencian la actividad urato oxidasa soluble, se encontró que los detergentes catiónicos, por ejemplo, sales de amonio cuaternario, disminuyen la actividad enzimática total con el aumento de la concentración. Los autores concluyeron que los detergentes catiónicos no eran útiles para purificar urato oxidasa de riñón de buey.

La solubilización de proteínas recombinantes, hormona de crecimiento porcina, metionil-hormona de crecimiento porcina, proteína del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, proteína de fusión con B-galactosidasa, de células o cuerpos de inclusión de *E. coli*, con tensioactivos catiónicos se describe en la patente estadounidense n.º 4.797.474, la patente estadounidense n.º 4.992.531, la patente estadounidense n.º 4.966.963 y la patente estadounidense n.º 5.008.377. La solubilización en condiciones alcalinas se lleva a cabo usando compuestos de amonio cuaternario incluyendo cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de n-alquil-dimetil-bencilamonio mixto, CPC,

cloruro de N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenoxi]etoxi]etil]bencenometanamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio. Estas publicaciones mencionan que, tras cada procedimiento de solubilización, las disoluciones se centrifugan y se observa poco o ningún sedimento en cada caso. Esta observación sugiere que la mayoría o todas las proteínas se solubilizan sin considerar la selectividad para la solubilización de una proteína diana. No se indica la pureza de las proteínas recuperadas. La patente estadounidense n.º 5.929.231, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad, describe la disgregación de gránulos y agregados que contienen almidones con cloruro de cetilpiridinio (CPC). Por tanto, la técnica anterior se refiere al uso de tensioactivos catiónicos para la solubilización general, no específica de macromoléculas biológicas particuladas. Estos métodos de la técnica anterior no dan a conocer el aumento de la pureza de una proteína diana deseada con respecto a la proteína total con un tensioactivo catiónico.

Se han usado tensioactivos catiónicos para eluir macromoléculas biológicas adsorbidas a resinas de intercambio catiónico o adyuvantes que contienen aluminio (Antonopoulos, *et al.* (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 54:213-226; Embery (1976) *J. Biol. Buccale* 4:229-236; y Rinella, *et al.* (1998) *J. Colloid Interface Sci.* 197:48-56.

La patente estadounidense n.º 4.169.764 describe la elución de urocinasa de columnas de carboximetilcelulosa usando una amplia variedad de disoluciones de tensioactivo catiónico. Los autores establecen una preferencia por el uso de sales de amonio tetrasustituidas en las que un grupo alquilo es un grupo alquilo superior de hasta 20 átomos de carbono y los otros son grupos alquilo inferiores de hasta 6 átomos de carbono. El uso de tales tensioactivos catiónicos permite la separación de macromoléculas biológicas de su unión a una matriz sólida.

A la inversa, la impregnación de filtros tales como los compuestos de nailon, con tensioactivo catiónico permite la inmovilización de polisacáridos o ácidos nucleicos (Maccari y Volpi (2002) *Electrophoresis* 23:3270-3277; Benitz, *et al.* (1990) patente estadounidense n.º 4.945.086; Macfarlane (1991) patente estadounidense n.º 5.010.183.

Este fenómeno se debe aparentemente a las interacciones de tensioactivo catiónico-polianión que permiten la precipitación del polianión.

Está bien establecido que los compuestos de amonio anfipáticos, que comprenden compuestos de amonio cuaternario de fórmula general QN^+ y compuestos de amonio primario con cadena de parafina de fórmula general RNH_3^+ , pueden precipitar polianiones en condiciones definidas (revisado en Scott (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 18:428-429; Scott (1960) *Methods Biochem. Anal.* 8:145-197; Laurent, *et al.*, (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 42:476-485; Scott (1961) *Biochem. J.* 81:418-424; Pearce y Mathieson (1967) *Can. J. Biochemistry* 45:1565-1576; Lee (1973) *Fukushima J. Med. Sci.* 19:33-39; Balazs, (1979) patente estadounidense n.º 4.141.973; Takemoto, *et al.*, (1982) patente estadounidense n.º 4.312.979; Rosenberg (1981) patente estadounidense n.º 4.301.153; Takemoto, *et al.*, (1984) patente estadounidense n.º 4.425.431; d'Hinterland, *et al.*, (1984) patente estadounidense n.º 4.460.575; Kozma, *et al.* (2000) *Mol. Cell. Biochem.* 203:103-112. Esta precipitación depende de las especies precipitantes que tienen una alta densidad de carga de polianiones y alto peso molecular (Saito (1955) *Kolloid-Z* 143:66.

La presencia de sales puede interferir con o revertir la precipitación de polianiones inducida por tensioactivos catiónicos.

Adicionalmente, los polianiones pueden precipitar de manera diferencial de disoluciones que contienen contaminantes proteicos, en condiciones de pH alcalino. En tales casos, las proteínas no unidas químicamente a los polianiones permanecerán en disolución, mientras que los polianiones y otras moléculas unidas a los polianiones precipitarán. Por ejemplo, la precipitación de polianiones tales como polisacáridos y ácidos nucleicos va acompañada por la coprecipitación de moléculas tales como proteoglicanos y proteínas que interaccionan con los polianiones (Blumberg y Ogston (1958) *Biochem. J.* 68:183-188; Matsumura, *et al.*, (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 69: 574-576; Serafini-Fracassini, *et al.* (1967) *Biochem. J.* 105:569-575; Smith, *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:11046-11051; Fuks y Vlodavsky (1994) patente estadounidense n.º 5.362.641; Hascall y Heinegard (1974) *J. Biol. Chem.* 249:4232-4241, 4242-4249 y 4250-4256; Heinegard y Hascall (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 427-441; Moreno, *et al.* (1988) patente estadounidense n.º 4.753.796; Lee, *et al.* (1992) *J. Cell Biol.* 116: 545-557; Varelas, *et al.* (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 321: 21-30.

El punto isoeléctrico (o pI) de una proteína es el pH al que la proteína tiene un número igual de cargas positivas y negativas. En condiciones de disolución con valores de pH próximos a (especialmente por debajo de) el punto isoeléctrico de una proteína, las proteínas pueden formar sales estables con polianiones fuertemente ácidos tales como heparina. En condiciones que promueven la precipitación de tales polianiones, las proteínas complejadas con los polianiones también precipitan (LB Jaques (1943) *Biochem. J.* 37:189-195; AS Jones (1953) *Biochim. Biophys. Acta* 10:607-612; JE Scott (1955) *Chem e Ind* 168-169; patente estadounidense n.º 3.931.399 (Bohn, *et al.*, 1976) y patente estadounidense n.º 4.297.344 (Schwinn, *et al.*, 1981) .

La patente estadounidense n.º 4.421.650, la patente estadounidense n.º 5.633.227 y Smith, *et al.* ((1984) *J. Biol.*

Chem. 259:11046-11051) describen la purificación de polianiones mediante el tratamiento secuencial con un tensioactivo catiónico y sulfato de amonio (que permite la disociación de complejos de polianión-tensioactivo catiónico) y la posterior separación usando cromatografía de interacciones hidrófobas. La publicación de patente europea EP055188 describe la separación permitida por tensioactivo catiónico de la toxina RTX del lipopolisacárido. Sin embargo, no hay un equilibrio de masas en la cantidad de lipopolisacárido que se cuantifica mediante ensayos de actividad de endotoxina. Se ha demostrado la neutralización de la actividad de endotoxina mediante compuestos catiónicos que interaccionan fuertemente (Cooper JF (1990) J Parenter Sci Technol 44:13-5).

Por tanto, en el documento EP055188, la falta de actividad de endotoxina en el precipitado tras el tratamiento con cantidades crecientes de tensioactivo catiónico resulta posiblemente de la neutralización de la actividad por la formación del complejo de tensioactivo-lipopolisacárido.

Los métodos mencionados anteriormente requieren polianiones, soportes sólidos o agregados que comprenden proteínas intermediarios con solubilidad selectiva por un tensioactivo catiónico para permitir la purificación de proteínas solubles usando tensioactivo catiónico. Por tanto, la técnica anterior no proporciona un método de purificación de una proteína diana poniendo en contacto la proteína con un tensioactivo catiónico en una cantidad eficaz para precipitar preferentemente proteínas distintas de la proteína diana, es decir, proteínas contaminantes, particularmente cuando tal puesta en contacto se realiza en ausencia de polianiones, soportes sólidos o agregados de proteínas intermediarios. A menudo, un experto en la técnica encuentra mezclas de proteínas solubles y no tiene un medio sencillo, eficaz para purificar la proteína deseada. El método novedoso para purificar proteínas, descrito en el presente documento, permite la purificación eficaz de proteínas diana mediante el uso de tensioactivos catiónicos para precipitar preferentemente proteínas distintas de la proteína diana. Preferiblemente tal precipitación de proteínas contaminantes es directa, y no depende de la presencia de polianiones, soportes sólidos o agregados que comprenden las proteínas contaminantes y otras moléculas.

Sumario de la invención

La invención objeto proporciona un método para purificar una proteína diana según la reivindicación 1 en el presente documento.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método según la reivindicación 9 en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa los efectos de la concentración de CPC sobre la actividad y la pureza de uricasa. La concentración de proteína (A) y la actividad enzimática (B) de uricasa de mamífero, a partir de cuerpos de inclusión disueltos de *E. coli*, se miden tras los tratamientos con CPC indicados y la separación centrífuga. La actividad específica (C) de cada aislado se calcula como una razón de estos valores (actividad/concentración de proteína).

La figura 2 representa el análisis cromatográfico mediante HPLC de exclusión molecular de uricasa de mamífero en bruto preparada a partir de cuerpos de inclusión y tras el tratamiento con CPC al 0,075%. Se analizan los perfiles de HPLC de exclusión molecular de A. cuerpos de inclusión de *E. coli* solubilizados sin tratamiento con CPC, y B. el sobrenadante tras precipitación con CPC (0,075%) y filtración. Las áreas de cada pico y el porcentaje de área total se resumen en las tablas adjuntas.

La figura 3 representa el análisis mediante SDS-PAGE (gel al 15%) de uricasa tratada con CPC. Las muestras que contienen uricasa se preparan tal como se describe en el ejemplo 1. Se toman alícuotas de muestras de diversas etapas del procedimiento tal como sigue: carril 1- CI disueltos; carril 2 - sobrenadante tras el tratamiento con CPC; carril 3 - sedimento tras el tratamiento con CPC.

La figura 4 representa el análisis mediante HPLC de exclusión molecular de anticuerpo scFv en bruto tras el tratamiento con CPC al 0,02%. Se analizan los perfiles de HPLC de exclusión molecular de A. anticuerpo scFv BTG-271 como patrón de referencia, B. cuerpos de inclusión solubilizados, y C. el sobrenadante tras el replegamiento y la precipitación con CPC (0,02%) y filtración. Las áreas de cada pico y el porcentaje de área total se resumen en las tablas adjuntas.

La figura 5 representa el análisis mediante SDS-PAGE (gel al 15%) de anticuerpo scFv tratado con CPC. Las muestras que contienen el anticuerpo scFv de diversas etapas del procedimiento y los patrones se presentan en el orden siguiente: carril 1 - patrones de peso molecular; carril 2 - CI disueltos; carril 3 - proteína replegada; carril 4 - sedimento de CPC; carril 5 - sobrenadante tras el tratamiento con CPC.

La figura 6 representa la cromatografía de filtración en gel de HPLC de interferón beta antes y después del tratamiento con CPC.

A. Antes del tratamiento con CPC

B. Tras el tratamiento con CPC.

Se cargaron en la columna 200 µl de una disolución de interferón beta 0,1 mg/ml.

Descripción detallada de la invención

- 5 Las proteínas son anfóteras, que tienen cargas tanto positivas como negativas. El pH de una disolución y las moléculas cargadas que interactúan con una proteína afectan a la carga neta de esa proteína. Pueden producirse interacciones fuertes entre las proteínas cuando la carga neta de una proteína es neutra (el punto isoelectrico). Cuando el pH de la disolución está por debajo del punto isoelectrico de la proteína, la proteína tiene una carga positiva neta, y puede haber repulsión electrostática entre moléculas catiónicas, incluyendo otras proteínas.
- 10 Un objeto de la invención es proporcionar un método para purificar una proteína diana solubilizada a partir de una disolución que comprende una mezcla de la proteína diana y proteínas contaminantes que comprende poner en contacto la mezcla solubilizada con una cantidad eficaz de un tensioactivo catiónico y recuperar la proteína diana. Los tensioactivos catiónicos son moléculas de superficie activa con una carga positiva. En general, estos compuestos también tienen al menos un grupo alifático no polar. La proteína diana tiene un punto isoelectrico mayor de 7. En una realización particular, el pH de la disolución es aproximadamente igual al punto isoelectrico de la proteína diana. En una realización particular, cuando el pH de la disolución está por encima del punto isoelectrico de la proteína diana, el pH de la disolución está dentro de 1-2 unidades de pH del punto isoelectrico de la proteína diana. En una realización particular, cuando el pH de la disolución está por encima del punto isoelectrico de la proteína diana, el pH de la disolución está dentro de 1 unidad de pH del punto isoelectrico de la proteína diana.
- 15 La proteína o proteínas contaminantes se hacen precipitar preferentemente, aumentando así la proporción de las proteínas que quedan en disolución representadas por la proteína diana. Por ejemplo, partiendo de una disolución de proteína diana y proteína contaminante en la que la proteína diana es el 20% de la proteína total en disolución, puede purificarse la proteína diana usando los métodos proporcionados para lograr una disolución en la que la proteína diana es el 30% o más, el 40% o más, el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 80% o más, el 90% o más, el 95% o más de la proteína total que queda en disolución.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "precipitar preferentemente" significa que se hace precipitar una proteína o grupo de proteínas en un mayor grado que otra proteína o grupo de proteínas. Por ejemplo, en el caso de una mezcla de una proteína diana y proteínas contaminantes, se hacen precipitar las proteínas contaminantes preferentemente con respecto a la proteína diana cuando se hace precipitar el 20% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 20% de la proteína diana. Preferiblemente, se hace precipitar un alto porcentaje de proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar un bajo porcentaje de la proteína diana. En realizaciones preferidas, se hace precipitar el 30% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 30% de la proteína diana; se hace precipitar el 40% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 40% de la proteína diana; se hace precipitar el 50% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 50% de la proteína diana; se hace precipitar el 60% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 60% de la proteína diana; se hace precipitar el 70% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 70% de la proteína diana; se hace precipitar el 80% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 80% de la proteína diana; se hace precipitar el 90% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 90% de la proteína diana; se hace precipitar el 95% o más de las proteínas contaminantes, mientras que se hace precipitar menos del 95% de la proteína diana. Preferiblemente, se hace precipitar un pequeño porcentaje de la proteína diana. Por ejemplo, se hace precipitar menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% de la proteína diana.
- 25 En una realización particular, la cantidad total de proteína en disolución (proteína diana más proteína contaminante), antes de llevar a cabo el método de purificación de la invención es de desde 0,1 hasta 10 mg/ml. En realizaciones particulares, la cantidad total de proteína en disolución antes de llevar a cabo el método de purificación de la invención es de desde 0,1 hasta 3 mg/ml, de 0,3 a 2 mg/ml, de 0,5 a 2 mg/ml, de 0,5 a 1 mg/ml, de 1 a 2 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml.
- 30 En realizaciones particulares, la precipitación preferente de proteínas contaminantes es directa, y no depende, o no depende sustancialmente, de la presencia de polianiones. En otra realización, la precipitación preferente de proteínas contaminantes es directa, y no depende, o no depende sustancialmente, de la presencia de un soporte sólido. En otra realización, la precipitación preferente de proteínas contaminantes no depende, o no depende sustancialmente, de la presencia de agregados entre proteínas contaminantes y otras moléculas. La precipitación preferente de proteínas contaminantes no depende o depende sustancialmente de un componente (por ejemplo,
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

5 polianiones, soportes sólidos o agregados de proteínas contaminantes y otras moléculas) cuando, por ejemplo, la eliminación de ese componente no afecta o no afecta sustancialmente, respectivamente, a la precipitación preferente de la proteína contaminante. Un ejemplo de un efecto insustancial de la eliminación de un componente sería que las proteínas contaminantes se hicieran precipitar preferentemente tanto cuando el componente está presente como cuando está ausente. Un ejemplo adicional sería que las proteínas contaminantes se hicieran precipitar preferentemente en el mismo grado cuando el componente está presente y cuando está ausente. Preferiblemente, la misma o sustancialmente la misma cantidad de proteínas contaminantes precipitan en ausencia o ausencia sustancial del componente igual que en presencia del componente.

10 En otra realización, el método se realiza en ausencia de polianiones o en ausencia de cantidades sustanciales de polianiones. En otra realización, el método se realiza en ausencia de un soporte sólido o en ausencia de un soporte sólido sustancial. En otra realización, el método se realiza en ausencia de agregados entre proteínas contaminantes y otras moléculas, o en ausencia de cantidades sustanciales de agregados entre proteínas contaminantes y otras moléculas. Preferiblemente, el método se realiza en ausencia de o en ausencia de cantidades sustanciales de dos o 15 y tres miembros del grupo que consiste en polianiones; un soporte sólido; y agregados entre proteínas contaminantes y otras moléculas.

Una vez proporcionado el método de la invención, para un experto en la técnica es rutina seleccionar el tensioactivo particular usado y las condiciones, por ejemplo, pH, temperatura, salinidad, concentración de tensioactivo catiónico, concentración de proteína total, en las que se lleva a cabo este procedimiento para potenciar la eficacia de la purificación de una proteína diana particular. Por ejemplo, pueden compararse purificaciones realizadas a diferentes 20 valores de pH y concentraciones de tensioactivo para establecer las condiciones de purificación óptimas. Ejemplos de este procedimiento se proporcionan a continuación en la sección de ejemplos. En una realización particular, el pH de la disolución se escoge de manera que sea tan alto como sea posible sin reducir sustancialmente la cantidad de proteína diana recuperada.

25 También se da a conocer en el presente documento un método para determinar las condiciones que permiten la purificación eficaz de proteínas diana basándose en su solubilidad, tal como resulta afectada por tensioactivos catiónicos.

Una cantidad eficaz de tensioactivo catiónico es una cantidad de tensioactivo que produce la precipitación preferente de proteínas contaminantes. En realizaciones particulares, la cantidad eficaz de tensioactivo hace precipitar el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de las proteínas contaminantes.

30 En una realización de la invención, el tensioactivo catiónico se añade a una concentración de desde el 0,001% hasta el 5,0%, preferiblemente el tensioactivo catiónico se añade a una concentración de desde el 0,01% hasta el 0,5% y más preferiblemente, el tensioactivo catiónico se añade a una concentración de desde el 0,03% hasta el 0,2%. En realizaciones particulares, el tensioactivo catiónico se añade a una concentración de desde el 0,01% hasta el 0,1%, del 0,01% al 0,075%, del 0,01% al 0,05% o del 0,01% al 0,03%.

35 El método mencionado anteriormente se lleva a cabo cuando el tensioactivo catiónico es un compuesto de amonio anfipático.

40 En una realización preferida, la proteína diana solubilizada se somete a procesamiento adicional una vez que las proteínas contaminantes se han hecho precipitar preferentemente. Un procesamiento adicional de este tipo puede incluir etapas de purificación adicionales, ensayos para determinar la actividad o la concentración, diálisis, cromatografía (por ejemplo, HPLC, cromatografía de exclusión molecular), electroforesis, diálisis, etc.

45 Tal como se usa en el presente documento, los compuestos de amonio anfipáticos comprenden compuestos que tienen tanto componentes catiónicos como no polares con la fórmula general de o bien QN^+ o bien RNH_3^+ . Q indica que el nitrógeno es un amonio cuaternario (unido covalentemente a cuatro grupos orgánicos que pueden estar unidos entre sí o no). Cuando los grupos orgánicos están unidos entre sí, pueden formar compuestos aromáticos o alifáticos cíclicos, dependiendo de la configuración electrónica de los enlaces entre los componentes que forman la estructura cíclica. Cuando el compuesto de amonio anfipático seleccionado tiene la fórmula general, RNH_3^+ , el compuesto es una amina primaria en la que R es un grupo alifático. Los grupos alifáticos son grupos orgánicos de cadena abierta.

50 En una realización de la invención, el compuesto de amonio anfipático seleccionado puede formar una sal con un haluro. Comúnmente, sales de haluro se refieren a las que comprenden iones fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

En una realización de la invención, el compuesto de amonio anfipático tiene al menos una cadena alifática que tiene 6-20 átomos de carbono, preferiblemente, el compuesto de amonio anfipático tiene al menos una cadena alifática que tiene 8-18 átomos de carbono.

En una realización de la invención, el compuesto de amonio anfipático seleccionado se selecciona del grupo que consiste en sales de cetilpiridinio, sales de estearamida-metilpiridinio, sales de laurilpiridinio, sales de cetilquinolinio, sales de éster metílico del ácido laurilaminopropiónico, sales metálicas del ácido laurilaminopropiónico, lauril dimetil betaína, estearil dimetil betaína, lauril dihidroxietil betaína y sales de bencetonio.

5 Los compuestos de amonio anfipáticos que pueden usarse incluyen cloruro de hexadecilpiridinio, acetato de decualinio, cloruro de hexadecilpiridinio, cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de n-alkil-dimetil-bencilamonio mixto, cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenoxi]etoxi]etil[bencenometanamonio, cloruro de alquil-dimetilbencil-amonio y cloruro de dicloro-bencildimetil-
10 alquilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, lauril dimetil betaína, estearil dimetil betaína y lauril dihidroxietil betaína.

En una realización de la invención, el compuesto de amonio anfipático es una sal de cetilpiridinio tal como cloruro de cetilpiridinio.

15 En una realización de la invención, la mezcla que contiene la proteína deseada comprende además componentes celulares tales como componentes celulares derivados de microorganismos, por ejemplo, de bacterias tales como *E. coli*.

En una realización de la invención, los componentes celulares son una o más proteínas.

En una realización de la invención, la proteína diana puede ser una proteína recombinante, por ejemplo, una enzima.

20 El método de la invención puede usarse para purificar una variedad de proteínas. Estas proteínas pueden incluir anticuerpos, uricasa, interferón-beta, inhibidor del factor X de sanguijuela, desoxirribonucleasa ácida II, elastasa, lisozima, papaína, peroxidasa, ribonucleasa pancreática, tripsinógeno, tripsina, citocromo c, erabutoxina, enterotoxina C1 de *Staphylococcus aureus* y monoaminoxidasa A, y otras proteínas que están cargadas positivamente en condiciones alcalinas.

25 En una realización de la invención, la proteína diana puede ser un anticuerpo, receptor, enzima, proteína de transporte, hormona o fragmento de los mismos o un conjugado por ejemplo, conjugado con una segunda proteína o un producto químico o una toxina.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, humanizados, quiméricos, de cadena sencilla, biespecíficos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores, pero con la condición de que en las condiciones de la purificación el anticuerpo esté cargado positivamente.

30 Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante el cultivo continuo de líneas celulares. Éstas incluyen la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, Nature 256,495-497; y patente estadounidense n.º 4.376.110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4, 72; Cole *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030) y la técnica del hibridoma-VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).
35

40 Tales anticuerpos pueden usarse como base a partir de la cual clonar y por tanto expresar de manera recombinante cadenas pesadas y ligeras individuales. Las dos cadenas pueden expresarse de manera recombinante en la misma célula o pueden combinarse *in vitro* tras la expresión separada y purificación. Pueden transfectarse ácidos nucleicos (por ejemplo, en un vector de plásmido) que codifican para una cadena pesada o ligera deseada o que codifican para una molécula que comprende un dominio variable de cadena pesada o ligera deseada en una célula que expresa una cadena pesada o ligera de anticuerpo diferenciada o una molécula que comprende una cadena pesada o ligera de anticuerpo, para la expresión de una proteína multimérica. Alternativamente, pueden expresarse y usarse opcionalmente cadenas pesadas o moléculas que comprenden la región variable de las mismas o una CDR de las mismas sin la presencia de una región variable de cadena ligera o cadena ligera complementaria. En otras
45 realizaciones, tales anticuerpos y proteínas pueden modificarse en el extremo N o C-terminal, por ejemplo, mediante amidación C-terminal o acetilación N-terminal.

50 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un AcM murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; y Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 5.816.397.). Las técnicas para la producción de anticuerpos quiméricos incluyen el corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica deseada (véanse por ejemplo, Morrison, *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger, *et al.*, 1984, Nature 312, 604-608; Takeda, *et al.*, 1985, Nature

314, 452-454).

5 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones de entramado de una molécula de inmunoglobulina humana. Las técnicas para la producción de anticuerpos humanizados se describen por ejemplo en Queen, patente estadounidense n.º 5.585.089 y Winter, patente estadounidense n.º 5.225.539. La extensión de las regiones de entramado y las CDR se ha definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services (1983).

10 Se forman anticuerpos de cadena sencilla uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se describen por ejemplo en la patente estadounidense 4.946.778; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston, *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; y Ward, *et al.*, 1989, Nature 334, 544-546).

15 Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo obtenido por ingeniería genética que reconoce dos tipos de dianas, por ejemplo (1) un epítipo específico y (2) una molécula "desencadenante", por ejemplo receptores de Fc en células mieloides. Tales anticuerpos biespecíficos pueden prepararse o bien mediante conjugación química, hibridoma, o bien mediante técnicas de biología molecular recombinante.

20 Los fragmentos de anticuerpo incluyen: Los fragmentos F(ab')₂, que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos F(ab'), que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse, *et al.*, 1989, Science 246, 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

En una realización de la invención, la proteína es uricasa.

En otra realización de la invención, la uricasa es una uricasa de mamífero.

En otra realización de la invención, la uricasa de mamífero es una uricasa de mamífero variante

25 En otra realización de la invención, la uricasa de mamífero es una uricasa porcina.

En otra realización de la invención, la uricasa porcina variante se denomina uricasa PKS Δ N.

En otra realización de la invención, la proteína es un anticuerpo.

En otra realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

En otra realización de la invención, la proteína es un interferón.

30 En otra realización de la invención, el interferón es interferón beta. En una realización particular, el interferón es interferón beta 1b. Nagola, S. *et al.*, Nature, 284:316 (1980); Goeddel, D. V. *et al.*, Nature, 287:411 (1980); Yelverton, E. *et al.*, Nuc Acid Res., 9:731 (1981); Streuli, M. *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.), 78:2848 (1981); solicitud de patente europea n.º 28033, publicada el 6 de mayo de 1981; 321134, publicada el 15 de julio de 1981; 34307 publicada el 26 de agosto de 1981; y patente belga n.º 837379, expedida el 1 de julio de 1981 describieron diversos métodos para la producción de interferón-beta empleando técnicas de ADN recombinante. Los procedimientos para la recuperación y purificación de IFN producidos de manera bacteriana se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 4.450.103; 4.315.852; 4.343.735; y 4.343.736; y Derynck *et al.*, Nature (1980) 287:193-197 y Scandella y Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971).

40 En una realización particular, la proteína diana es factor Xa de sanguijuela. El factor Xa de sanguijuela puede producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como el método descrito en la patente estadounidense n.º 6.211.341 y la publicación de patente internacional n.º WO 94/23735.

45 En una realización de la invención, la puesta en contacto se realiza durante entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 48 horas, más preferiblemente desde aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas.

En una realización de la invención, la puesta en contacto se realiza a una temperatura de desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 36°C; más preferiblemente de desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 26°C.

5 La invención objeto también proporciona el uso de tensioactivo catiónico como agente único para purificar una proteína que tiene un punto isoeléctrico mayor de 7 en condiciones alcalinas.

La invención objeto también proporciona una uricasa purificada en condiciones alcalinas a partir de una mezcla mediante la adición de cloruro de cetilpiridinio a la mezcla.

10 En una realización de la invención, la uricasa se obtiene de una célula bacteriana que comprende ADN que codifica para la uricasa mediante un método que comprende tratar la célula bacteriana para que exprese el ADN y produzca la uricasa y recuperar la uricasa.

En una realización de la invención, la uricasa se recupera a partir de precipitados dentro de la célula bacteriana.

La invención objeto también proporciona uricasa purificada para su uso en la preparación de un conjugado de uricasa-polímero.

15 También se da a conocer en el presente documento una proteína purificada que tiene un punto isoeléctrico mayor de 7 que puede obtenerse mediante un método que comprende poner en contacto una mezcla que contiene la proteína con una cantidad eficaz de un tensioactivo catiónico en condiciones tales que la proteína está cargada positivamente o tiene una zona de carga positiva, y recuperar la proteína.

La invención objeto también proporciona el uso de una sal de cetilpiridinio para purificar una proteína que tiene un punto isoeléctrico mayor de 7.

20 En cuanto al pH, en realizaciones en las que la mezcla se pone en contacto con una cantidad eficaz de un tensioactivo catiónico en condiciones tales que la proteína diana está cargada positivamente, el pH variará con la naturaleza de la proteína diana. Sin embargo, el pH está preferiblemente entre pH 7 y pH 11; intervalos preferidos son desde aproximadamente pH 7 hasta pH 10, de pH 7 a pH 9, de pH 8 a pH 11, de pH 8 a pH 10 o de pH 8 a pH 9.

25 Ejemplos

Los ejemplos que siguen se exponen para ayudar en la comprensión de la invención.

EJEMPLO 1. Uso de CPC para la purificación de uricasa de mamífero recombinante

1.1. Antecedentes

30 La uricasa de calidad farmacéutica debe estar esencialmente libre de proteína distinta de uricasa. Se acumuló intracelularmente uricasa de mamífero (punto isoeléctrico de 8,67) producida en *E. coli* en precipitados similares a orgánulos denominados cuerpos de inclusión (CI) que pueden aislarse fácilmente para la purificación adicional. A diferencia de la consideración clásica de que los CI contienen proteína expresada desordenada/con plegamiento erróneo, estos elementos de tipo CI contienen uricasa plegada correctamente en forma precipitada. La exposición de
35 elementos de tipo CI con uricasa a un pH alcalino, por ejemplo, aproximadamente pH 9-11, volvió a disolver la proteína precipitada. El contenido en uricasa en elementos de tipo CI solubilizados era de aproximadamente el 40 - 60% y requirió una amplia purificación para obtener una preparación de uricasa homogénea. En el presente documento, se demuestra la purificación de uricasa y otra proteína con CPC que puede evaluarse mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, puede evaluarse la pureza de uricasa de mamífero determinando la actividad específica, el número de bandas que aparecen tras la electroforesis y la tinción de geles de SDS-PAGE, y el número
40 y el tamaño de los picos que aparecen en un cromatograma tras la HPLC de exclusión molecular.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Tampón NaHCO₃ 50 mM (pH 10,3)

Se preparó este tampón disolviendo NaHCO₃ hasta una concentración final de 50 mM. Se ajustó el pH a 10,2 -10,4. Dependiendo del pH de partida, puede usarse HCl 0,1 M o NaOH 1 N.

45 1.2.2. Disolución de CPC al 10%

Se preparó CPC al 10% disolviendo CPC en agua destilada hasta una concentración final de 10 g/100 ml.

1.2.3. Expresión de uricasa porcina recombinante

5 Se expresó uricasa de mamífero recombinante (urato oxidasa) en *E. coli* K-12 cepa W3110 F⁻, tal como se describe en la publicación de patente internacional WO 00/08196 de Duke University y la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 60/095.489.

1.2.4. Cultivo y recogida de bacterias productoras de uricasa

Se cultivaron las bacterias a 37°C en medio de crecimiento que contenía hidrolizado de caseína, extracto de levadura, sales, glucosa y amoníaco.

10 Tras el cultivo, se recogieron las bacterias en las que se acumulaba la uricasa mediante centrifugación y se lavaron con agua para eliminar el medio de cultivo residual.

1.2.5. Alteración y recuperación celular

Se suspendió el sedimento celular recogido en tampón Tris 50 mM, pH 8,0 y EDTA 10 mM y se llevó hasta un volumen final de aproximadamente 20 veces el peso celular seco (PCS). Se añadió lisozima, a una concentración de 2000-3000 unidades/ml, al sedimento suspendido mientras se mezclaba y se incubó durante 16-20 horas, a 4-8°C.

15 Se trató el lisado celular mediante mezclado de alta cizalladura y posteriormente mediante sonicación. Se diluyó la suspensión con un volumen igual de agua desionizada y se centrifugó. Se diluyó el sedimento, que contenía cuerpos de inclusión con uricasa, con agua desionizada (p/p) y se centrifugó para eliminar adicionalmente las impurezas. Se guardó el sedimento obtenido a partir de esta última etapa de lavado para el procesamiento adicional y se desechó el sobrenadante.

20 1.2.6. Disolución

Se suspendió el sedimento con cuerpos de inclusión (CI) en tampón NaHCO₃ 50 mM, pH 10,3 ± 0,1. Se incubó la suspensión a una temperatura de 25 ± 2°C durante aproximadamente 0,5-2 horas para permitir la solubilización de uricasa derivada de CI.

1.2.7. Tratamiento con CPC

25 Se añadió disolución de CPC al 10% en alícuotas a CI homogenizados (pH 10,3), mientras se mezclaba enérgicamente, para obtener la concentración deseada de CPC. Se incubó la muestra durante de 1 a 24 horas tal como se indica, durante lo cual se formaron escamas precipitantes. Se centrifugó la muestra durante 15 minutos, a 12.000 x g. Se separaron el sedimento y el sobrenadante, y se suspendió el sedimento con tampón NaHCO₃ 50 mM (pH 10,3) hasta el volumen original. Se determinó la actividad enzimática de cada fracción, y se concentraron y se dializaron las fracciones para eliminar el CPC restante.

1.2.8. Ensayo de proteínas

Se determinó el contenido en proteínas de alícuotas de muestras de CI tratados y no tratados usando el método de Bradford modificado (Macart y Gerbaut (1982) Clin Chim Acta 122:93-101).

1.2.9. Ensayo de uricasa

35 1.2.9.1. Actividad enzimática

Se midió la actividad de uricasa mediante el método de UV (Fridovich, I. (1965) The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines. J Biol Chem, 240, 2491-2494; modificado mediante la incorporación de BSA 1 mg/ml). Se determinó la velocidad de la reacción enzimática, en muestras por duplicado, midiendo la disminución en la absorbancia a 292 nm que resulta de la oxidación del ácido úrico a alantoína. Una unidad de actividad se define como la cantidad de uricasa requerida para oxidar un µmol de ácido úrico por minuto, a 40 25°C, en las condiciones especificadas. La potencia de la uricasa se expresa en unidades de actividad por mg de proteína (U/mg).

El coeficiente de extinción de ácido úrico 1 mM a 292 nm en una longitud de trayectoria de 1 cm es de 12,2. Por tanto, la oxidación de 1 µmol de ácido úrico por ml de mezcla de reacción da como resultado una disminución en la absorbancia de 12,2 mA₂₉₂. Se obtuvo el cambio en la absorbancia con el tiempo (ΔA₂₉₂ por minuto) a partir de la

parte lineal de la curva. Entonces se calculó la actividad uricasa tal como sigue:

$$Actividad (U / ml) = \frac{\Delta A_{292nm} (AU / min) \times DF \times V_{RM}}{V_s \times 12,2}$$

en la que: DF = factor de dilución;

V_{RM} = volumen total de mezcla de reacción (en μ l)

5 V_S = volumen de muestra diluida usada en la mezcla de reacción (en μ l)

1.2.9.2. Análisis mediante HPLC con Superdex 200

10 Se cuantificaron la cantidad y el porcentaje relativo de la enzima uricasa nativa, así como de los posibles contaminantes, según el perfil de elución obtenido mediante HPLC usando una columna Superdex 200. Se inyectaron en la columna muestras por duplicado de disolución de uricasa. Se calcularon automáticamente las áreas de cada pico y el porcentaje de área total y se resumen en las tablas adyacentes.

1.2.10. Análisis mediante SDS-PAGE

Se separaron proteínas en muestras que contenían ~20 g de proteína/carril en geles de SDS-PAGE al 15%. Se tiñeron los geles resultantes con azul brillante de Coomassie.

1.3. RESULTADOS

15 En la tabla 1 y en la figura 1 se presentan los efectos del tratamiento con CPC (al 0,005 - 0,075%) (durante 1-24 horas) sobre la actividad uricasa recuperada en el sobrenadante y su pureza. Antes del tratamiento con CPC (a pH 10,3), la concentración de proteína era de 1,95 mg/ml, y la actividad enzimática específica era de 3,4-4,67 U/mg. Los resultados presentados en la figura 1B indican que dentro de cada periodo de incubación, la concentración de proteína del sobrenadante disminuyó al aumentar la concentración de CPC. A menos del 0,04% de CPC, se observó un efecto relativamente menor sobre la concentración de proteína. CPC, en concentraciones del 0,04% al 0,075%, pudo reducir la concentración de proteína hasta aproximadamente el 50% de la concentración original.

25 A diferencia de los efectos de CPC sobre la concentración de proteína total, la actividad uricasa soluble total no se vio influida significativamente por el aumento de la concentración de CPC y el tiempo de incubación (figura 1A). Dentro de cada periodo de incubación, la actividad enzimática específica (figura 1C) aumentó de manera sistemática como una función de la concentración de CPC dentro del intervalo del 0,04% - 0,075%. Este aumento fue un resultado de la eliminación específica de proteínas distintas de uricasa. Puesto que la actividad enzimática específica de la enzima purificada final era de aproximadamente 9 U/mg, la mayoría de las proteínas contaminantes se eliminaron mediante la precipitación con CPC. De hecho, los análisis mediante HPLC y SDS-PAGE realizados apoyan esta conclusión.

30 TABLA 1. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A CPC SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y LA PUREZA DE URICASA

Tiempo de incubación (h)	[CPC] (%)	Actividad uricasa (U/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Actividad específica de uricasa (U/mg)
1	0 (carga)	6,63	1,95	3,4
1	0,005	7,1	1,8	3,9
1	0,01	6,63	1,75	3,7
1	0,02	6,63	1,75	3,7
1	0,04	6,4	1,47	4,35
1	0,06	5,9	0,95	6,2
1	0,075	6,4	0,9	7,1

Tiempo de incubación (h)	[CPC] (%)	Actividad uricasa (U/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Actividad específica de uricasa (U/mg)
4	0,005	8,61	1,7	5,06
4	0,01	8,36	1,66	5,04
4	0,02	8,36	1,6	5,04
4	0,04	7,38	1,32	5,59
4	0,06	6,4	0,9	7,1
4	0,075	6,9	0,82	8,4
24	0,005	8,8	1,9	4,66
24	0,01	7,9	1,9	4,14
24	0,02	7,9	1,9	4,14
24	0,04	7,3	1,5	4,9
24	0,06	6,9	0,97	7,1
24	0,075	6,6	0,9	7,4
24	0 (carga)	9,1	1,95	4,67

1.4 Confirmación de la potenciación mediante CPC de la pureza de uricasa

Se aislaron y se solubilizaron CI que contenían uricasa, tal como se describe en la sección 1.3. Se analizaron muestras del material soluble antes del tratamiento con CPC y tras la filtración de la proteína precipitada con CPC.

5 1.4.1. Análisis mediante HPLC de proteínas distintas de uricasa tras el tratamiento con CPC al 0,075%

El análisis mediante HPLC de CI solubilizados indicó que el pico asociado con uricasa (tiempo de retención (TR) ~25,5 minutos) comprende aproximadamente el 46% de la proteína de la muestra de CI en bruto (figura 2A). Tras el tratamiento con CPC, el pico asociado con uricasa aumentó hasta aproximadamente el 92% de la proteína (figura 2B), y estuvo acompañado por una reducción significativa de los contaminantes que eluyen entre el TR de 15-22 min (figura 2A). El área del pico de uricasa es aproximadamente el 70% de la de la figura 2A. Por tanto, estos resultados indican una duplicación de la pureza de uricasa que resulta de la eliminación de proteínas distintas de uricasa tras el tratamiento con CPC.

1.4.2. Efecto de CPC al 0,075% sobre la actividad enzimática

Los resultados (presentados en la tabla 2) indican que el equilibrio de masas de la actividad uricasa se mantuvo durante el procedimiento de tratamiento. Se encontró que la exposición a CPC precipitaba el 60% de todas las proteínas en disolución. Más del 85% de la actividad enzimática permanecía en disolución, por tanto la eliminación de la proteína extraña permitió un aumento en la actividad específica del sobrenadante producido de más del 110%. Al igual que en la mayoría de los procedimientos de purificación, permaneció en el sedimento parte de la actividad deseada. En este caso, sólo el 17,6% de la actividad original permaneció en el sedimento (y se extrajo usando bicarbonato de sodio 50 mM (7 mSi, pH 10,3) para fines analíticos), que es una fracción relativamente menor de la cantidad total.

TABLA 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CPC SOBRE LA ACTIVIDAD URICASA

Muestra	Actividad total (U)	Actividad (U/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad recuperada (%)
Antes de CPC	490	4,9	2	2,46	100
Tras el tratamiento con CPC	418	4,18	0,8	5,2	85,3
Sedimento tras el tratamiento con CPC	86	0,8	-	-	17,6

1.4.3. Análisis mediante SDS-PAGE tras el tratamiento con CPC al 0,075%

5 Se analizaron muestras de la uricasa en bruto, antes de la exposición a CPC, y de las fracciones posteriores, tras la separación del material soluble e insoluble, tras el tratamiento con CPC, la separación centrífuga de las fracciones y la reconstitución del sedimento obtenido tras la centrifugación, que contenía cantidades iguales de proteína mediante metodología de SDS-PAGE. Los resultados (véase la figura 3) muestran la presencia de proteínas contaminantes antes del tratamiento con CPC. Tras el tratamiento con CPC, el sedimento contenía la mayoría de las proteínas contaminantes, mientras que el sobrenadante contenía uricasa que daba como resultado la única banda de proteína principal.

EJEMPLO 2. Efecto de CPC sobre la purificación de anticuerpos de cadena sencilla (scFv)

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Tampones

2.1.1.1. Tampón de disolución de cuerpos de inclusión

15 El tampón de disolución contenía urea 6 M, Tris 50 mM, EDTA 1 mM y cisteína 0,1 M. Se ajustó el pH del tampón a 8,5.

2.1.1.2. Tampón de plegamiento

El tampón de plegamiento contenía urea 1 M, NaCl 0,25 mM, EDTA 1 mM y cisteína 0,1 M. Se ajustó el pH del tampón a 10,0.

20 2.1.2. Expresión de anticuerpos scFv en bacterias

Se expresaron anticuerpos scFv (pI 8,9) en *E. coli* transformada con un vector que codifica para un scFv que tiene cisteína-lisina-alanina-lisina en el extremo carboxilo tal como se describe en la publicación PCT WO 02/059264.

2.1.3. Cultivo y recogida de bacterias productoras de anticuerpos scFv

25 Se cultivaron células bacterianas que contenían ScFv en medio mínimo, a pH 7,2, y se complementaron con L-arginina, concentración final del 0,5%, durante el periodo de cinco horas antes de la inducción. Se indujo la expresión de scFv mediante la limitación de la cantidad de glucosa en el medio. Se recogieron células bacterianas que contenían ScFv del cultivo mediante ultrafiltración.

2.1.4. Alteración y recuperación celular de cuerpos de inclusión

30 Se suspendió el sedimento celular recogido en tampón Tris 50 mM, pH 8,0 y EDTA 10 mM y se llevó hasta un volumen final de aproximadamente 20 veces el peso celular seco (PCS). Se añadió lisozima, a una concentración de 2000-3000 unidades/ml, al sedimento suspendido mientras se mezclaba, entonces se incubó durante 16-20 horas, a 4°C.

35 Entonces se trató el lisado celular mediante mezclado de alta cizalladura y posteriormente mediante sonicación. Se recuperaron los cuerpos de inclusión que contenían anticuerpos scFv mediante centrifugación a 10.000 x g. Se diluyó el sedimento aproximadamente dieciséis veces con agua desionizada (p/p) y se centrifugó para eliminar

adicionalmente las impurezas. Se guardó el sedimento obtenido a partir de esta última etapa de lavado para el procesamiento adicional.

2.1.5. Disolución y replegamiento

5 Se suspendió el sedimento enriquecido en CI en tampón de disolución de cuerpos de inclusión (véase anteriormente), se incubó durante 5 horas a temperatura ambiente y se replegó *in vitro* en una disolución basada en arginina/gutación oxidado. Tras el replegamiento, se dializó la proteína y se concentró mediante filtración de flujo tangencial frente a tampón que contenía urea/fosfato.

2.1.6. Tratamiento con CPC

10 Se añadió disolución de CPC al 10% a la mezcla de replegamiento de scFv hasta una concentración final del 0,02%, y tras 1-2 h de incubación, a temperatura ambiente, se separó el precipitado por filtración. El sobrenadante contenía el anticuerpo scFv.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Efecto de la concentración de CPC sobre el anticuerpo scFv recuperable

15 En la tabla 3 se presentan los efectos de CPC (a pH 7,5 ó 10) sobre la pureza y la recuperación de anticuerpo scFv. Antes del tratamiento con CPC, la cantidad inicial de proteína en CI era de 73 mg, que contenía 15,87 mg de anticuerpo scFv tal como se determinó por análisis mediante HPLC en Superdex 75. El tiempo de retención (TR) de los picos que contenían anticuerpo scFv fue de aproximadamente 20,6 minutos. Los resultados indican que la recuperación de proteína total disminuyó en general al aumentar la concentración de CPC, y la recuperación de anticuerpo scFv permaneció >80% cuando la concentración de CPC era <0,03%. Se logró una eliminación de
20 proteína contaminante más eficaz a pH 7,5 en relación con la conseguida a pH 10. Por tanto, se logró la purificación del anticuerpo scFv mediante tratamiento con CPC a del 1,01 al 0,03%.

Tabla 3. Efecto del tratamiento con CPC sobre la recuperación y la pureza de anticuerpo scFv

Tratamiento de CI solubles	Proteína total (mg)	scFv total mediante HPLC (mg)	Factor de purificación	% de recuperación de scFv mediante HPLC
Control (antes de CPC)	73	15,87		100
CPC al 0,01% (pH 10)	64	15,66	1,13	98,68
CPC al 0,01% (pH 7,5)	50,76	14,97	1,36	94,33
CPC al 0,015% (pH 10)	54	14,49	1,23	91,30
CPC al 0,015% (pH 7,5)	39,96	14,22	1,64	89,60
CPC al 0,02% (pH 10)	43	13,35	1,43	84,12
CPC al 0,02% (pH 7,5)	37,8	13,02	1,58	82,04
CPC al 0,03% (pH 10)	35	11,12	1,46	70,07
CPC al 0,03% (pH 7,5)	37,8	12,47	1,52	78,58

2.3. CONFIRMACIÓN DE LA POTENCIACIÓN MEDIANTE CPC DE LA PUREZA DE ANTICUERPO SCFV

25 2.3.1. Análisis mediante HPLC de la recuperación de scFv tras el tratamiento con CPC

El análisis mediante HPLC de proteína replegada indica que el pico asociado con anticuerpo scFv (tiempo de retención (TR) ~20,6 minutos) comprendía aproximadamente el 22,7% de la proteína de la proteína total (figura 4B). El cromatograma de la figura 4C indica que tras el tratamiento con CPC al 0,02%, el pico asociado con anticuerpo scFv del sobrenadante comprendía aproximadamente el 75,9% de la proteína total inyectada, una purificación de 3,3

veces. Por tanto, el tratamiento con CPC eliminó impurezas proteicas de las disoluciones de anticuerpo scFv.

2.3.2. Análisis mediante SDS-PAGE sobre la recuperación de scFv tras el tratamiento con CPC

Los resultados (véase la figura 5) indican que antes del tratamiento con CPC, la muestra contenía cantidades significativas de un gran número de proteínas. De manera similar, tras el tratamiento con CPC, el sedimento contenía un gran número de proteínas. Por el contrario, el sobrenadante tras el tratamiento con CPC contenía una banda de proteína principal, la del anticuerpo scFv.

EJEMPLO 3. Efecto de CPC sobre la purificación de interferón-beta recombinante

Se expresó interferón beta (IFN-beta, pl 8,5-8,9) en *E. coli* mediante métodos conocidos. Nagola, S. *et al.*, Nature, 284:316 (1980); Goedel, D. V. *et al.*, Nature, 287:411 (1980); Yelverton, E. *et al.*, Nuc Acid Res., 9:731 (1981); Streuli, M. *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. (EE.UU.), 78:2848 (1981); solicitud de patente europea n.º 28033, publicada el 6 de mayo de 1981; 321134, publicada el 15 de julio de 1981; 34307 publicada el 26 de agosto de 1981; y patente belga n.º 837379, expedida el 1 de julio de 1981 describieron diversos métodos para la producción de interferón-beta empleando técnicas de ADN recombinante. Los procedimientos para la recuperación y purificación de IFN producidos de manera bacteriana se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 4.450.103; 4.315.852; 4.343.735; y 4.343.736; y Derynck *et al.*, Nature (1980) 287:193-197 y Scandella y Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971). Se aislaron y se solubilizaron cuerpos de inclusión que contenían IFN-beta.

Se trató la disolución resultante con CPC. Los resultados mostrados en la figura 6 indican una disminución sustancial en el nivel de proteínas contaminantes presentes tras el tratamiento con CPC. La cantidad real de IFN-beta (área bajo el pico) no cambió de manera apreciable tras el tratamiento con CPC.

La tabla 4 resume los efectos del tratamiento con CPC. La proteína total (Bradford) disminuyó en un 40%, la absorbancia de UV disminuyó en aproximadamente el 40% pero la cantidad de IFN-beta permaneció sin cambios.

TABLA 4.

Muestra y tratamiento	Proteína (mg/ml)	D.O A ₂₈₀	Contenido en IFNb (mg/ml) ^a	Perfil de SEC
Control (tras plegamiento de proteína sin CPC, 1049-31)	0,51	1,55	0,069	El pico de T.R. 13 ^b min es el 15% del área total
Prueba (tras plegamiento de proteína y tratamiento con CPC al 0,05%, 1049-31)	0,3	1,0	0,069	El pico de T.R. 13 ^b min es el 7,34% del área total
^a Cuantificado mediante columna Vydac C4				
^b El perfil de SEC contenía varios picos. El pico que eluye a los 13 min (R.T. 13 min) se reduce con el tratamiento con CPC y corresponde a la región en la que eluyen las proteínas de alto peso molecular y variantes de las mismas				

EJEMPLO 4. Efecto de CPC sobre la purificación del inhibidor del factor Xa.

Se usó CPC para purificar el inhibidor del factor Xa de sanguijuela. El inhibidor del factor Xa de sanguijuela (FXaI, pl 8,4-9,1) puede producirse tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.211.341 y la publicación de patente internacional n.º WO 94/23735. Tras el aislamiento de cuerpos de inclusión (CI) que contenían FXaI, se purificó el FXaI de los CI sustancialmente tal como se describe en el ejemplo 1. Tras la disolución del sedimento con CI, se incubó la preparación con disolución de CPC al 10%. Entonces, se centrifugó la mezcla durante 15 minutos, a 12.000 x g. Se separaron el sedimento y el sobrenadante. Se suspendió el sedimento con tampón NaHCO₃ 50 mM hasta el volumen original. Se concentraron y se dializaron por separado el sedimento y el sobrenadante para eliminar el CPC restante. Se sometieron a ensayo el contenido y la actividad de la proteína y se encontró que FXaI era el componente predominante en el sobrenadante y estaba sustancialmente ausente del sedimento. Los resultados indican que el tratamiento con CPC potenció la eficacia de la recuperación y la pureza del FXaI recuperado.

EJEMPLO 5. Purificación de carboxipeptidasa B (CPB) mediante CPC

5 Se solubilizaron cantidades idénticas de cuerpos de inclusión obtenidos a partir de un clon que expresaba CPB en urea 8 M, pH 9,5 (control y prueba). Se describe la producción de CPB en la publicación de patente internacional n.º WO 96/23064 y en la patente estadounidense n.º 5.948.668. Se trató la muestra de prueba con CPC al 0,11% y se aclaró mediante filtración antes del replegamiento. Se llevó a cabo el replegamiento de las muestras de control y prueba diluyendo las disoluciones 1:8 en tampón de replegamiento. Tras el tratamiento con endoproteinasa durante la noche a temperatura ambiente, se cargaron cantidades iguales de disoluciones de control y prueba en una columna de DEAE-Sepharose. Se lavó la columna y se eluyó posteriormente la enzima activa con cloruro de sodio 60 mM en tampón Tris 20 mM pH 8.

Tabla 5.

Etapa de procedimiento	Parámetro	Tratamiento	
		Control	CPC al 0,11%
Disolución en urea 8 M tras aclaramiento	A ₂₈₀ total	960	494
	Contenido en proteína (mg)*	490	272
	pH	9,5	9,5
	Actividad enzimática (unidades)	Inactiva (**)	Inactiva (**)
Cromatografía posterior de 26,5 mg de proteína replegada (DEAE MP)	Contenido en proteína (mg)*	5,67	8,41
	Actividad enzimática (unidades)	258	4043
	Actividad específica (unidades/mg)	98	481
(*) Se llevó a cabo la determinación de la proteína mediante el método de Bradford			
(**) Antes del replegamiento la proteína era inactiva			

10

Los resultados presentados en la tabla 5 muestran que la DO total en el material tratado con CPC disminuyó en un 49,5% y el contenido en proteína total se redujo en un 44,5%. Resulta interesante que la actividad enzimática total recuperada en la muestra tratada con CPC aumentó en un 79%, lo que sugiere que CPC eliminó un componente que inhibía parcialmente la generación de enzima activa.

REIVINDICACIONES

1. Método para purificar una proteína diana que comprende
- 5 a. obtener una disolución que comprende una mezcla de una proteína diana solubilizada y una o más proteínas contaminantes solubilizadas y un tampón alcalino, en el que la proteína diana tiene un punto isoeléctrico mayor de 7 y está cargada positivamente a pH alcalino y la una o más proteínas contaminantes tienen una carga polianiónica;
- 10 b. poner en contacto la disolución que comprende la mezcla de la proteína diana solubilizada y la una o más proteínas contaminantes solubilizadas con uno o más tensioactivos catiónicos en una cantidad eficaz para precipitar preferentemente la una o más proteínas contaminantes, en el que el uno o más tensioactivos catiónicos son un compuesto de amonio anfipático seleccionado del grupo que consiste en compuestos de amonio cuaternario de fórmula general QN^+ ; compuestos de amonio primario con cadena de parafina de fórmula general RNH_3^+ ; y sales de los mismos, aumentando de ese modo la proporción de proteínas que quedan en disolución representadas por la proteína diana; y
- c. recuperar la proteína diana solubilizada.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto de amonio anfipático se selecciona del grupo que consiste en sales de cetilpiridinio, sales de estearamida-metilpiridinio, sales de laurilpiridinio, sales de cetilquinolinio, sales de éster metílico del ácido laurilaminopropiónico, sales metálicas del ácido laurilaminopropiónico, lauril dimetil betaína, estearil dimetil betaína, lauril dihidroxietil betaína y sales de bencetonio, y opcionalmente además o bien
- 20 (i) en el que el compuesto de amonio anfipático se selecciona de cloruro de hexadecilpiridinio, acetato de decualinio, cloruro de hexadecilpiridinio, cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de n-alkil-dimetil-bencilamonio mixto, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenoxi]etoxi]etil]bencenometanamonio, cloruro de alquil-dimetilbencil-amonio y cloruro de dicloro-bencildimetil-alkilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, lauril dimetil betaína, estearil dimetil betaína y lauril dihidroxietil betaína, o bien
- 25 (ii) en el que el compuesto de amonio anfipático es una sal de cetilpiridinio, preferiblemente/opcionalmente una sal de haluro, preferiblemente/opcionalmente cloruro de cetilpiridinio, en el que el compuesto de amonio anfipático tiene opcionalmente al menos una cadena alifática que tiene 6-20 átomos de carbono, preferiblemente/opcionalmente 8-18 átomos de carbono.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución comprende además uno o más componentes celulares, preferiblemente/opcionalmente
- 30 (i) derivados de un microorganismo, preferiblemente/opcionalmente bacterias, preferiblemente/opcionalmente *E. coli*, o
- (ii) en el que el uno o más componentes celulares son una o más proteínas.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína diana es
- (i) una proteína recombinante, preferiblemente/opcionalmente una enzima, o
- 35 (ii) un anticuerpo, preferiblemente/opcionalmente un anticuerpo de cadena sencilla, o
- (iii) un interferón, preferiblemente/opcionalmente un interferón-beta, o
- (iv) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, una uricasa, un interferón-beta, un inhibidor del factor X, una desoxirribonucleasa ácida II, una elastasa, una lisozima, una papaína, una peroxidasa, una ribonucleasa pancreática, un tripsinógeno, una tripsina, un citocromo c, una erabutoxina, enterotoxina C1 de *Staphylococcus aureus*, un interferón y una monoaminooxidasa A, en el que la proteína diana es preferiblemente una uricasa, preferiblemente/opcionalmente una uricasa de mamífero, y preferiblemente/opcionalmente una uricasa porcina.
- 40 5. Método según la reivindicación 1, en el que el uno o más tensioactivos catiónicos se añaden a una concentración de desde el 0,001% hasta el 5,0%, preferiblemente/opcionalmente desde el 0,01% hasta el 0,5% y más preferiblemente/opcionalmente desde el 0,03% hasta el 0,2%.
- 45 6. Método según la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto se realiza durante desde 5 minutos hasta 48 horas, preferiblemente/opcionalmente, desde 10 minutos hasta 24 horas, o se realiza a una temperatura de desde

4°C hasta 36°C preferiblemente/opcionalmente desde 4°C hasta 26°C.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución está sustancialmente libre de

(i) polianiones, o

(ii) soportes sólidos, o

5 (iii) agregados de las proteínas contaminantes con otras moléculas,

o

(iv) polianiones, soportes sólidos y agregados de las proteínas contaminantes con otras moléculas.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tensioactivo catiónico es una sal de cetilpiridinio, preferiblemente/opcionalmente cloruro de cetilpiridinio.

10 9. Método de aumento del porcentaje de una proteína diana en una disolución de proteínas que comprende las etapas de:

a. obtener una disolución de una pluralidad de proteínas, en el que las proteínas en disolución comprenden la proteína diana, una o más proteínas contaminantes y un tampón alcalino, y la proteína diana comprende un primer porcentaje en peso de la proteína total en la disolución, en el que la proteína diana tiene un punto isoeléctrico mayor de 7 y está cargada positivamente a pH alcalino y la una o más proteínas contaminantes tienen una carga polianiónica; y

15

b. poner en contacto la disolución con uno o más tensioactivos catiónicos en una cantidad eficaz para precipitar preferentemente las proteínas contaminantes, en el que el uno o más tensioactivos catiónicos es un compuesto de amonio anfipático seleccionado del grupo que consiste en compuestos de amonio cuaternario de fórmula general QN^+ ; compuestos de amonio primario con cadena de parafina de fórmula general RNH_3^+ ; y sales de los mismos;

20

en el que la proteína diana en la disolución de la etapa (b) comprende un segundo porcentaje en peso de la proteína total, y el segundo porcentaje es mayor que el primer porcentaje.

FIG. 1A

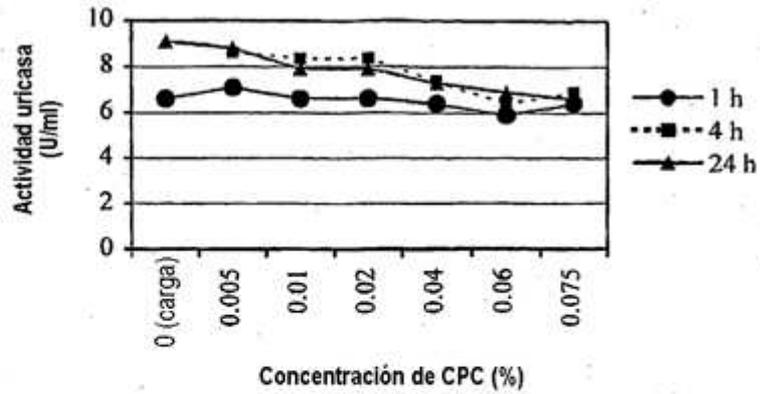


FIG. 1B

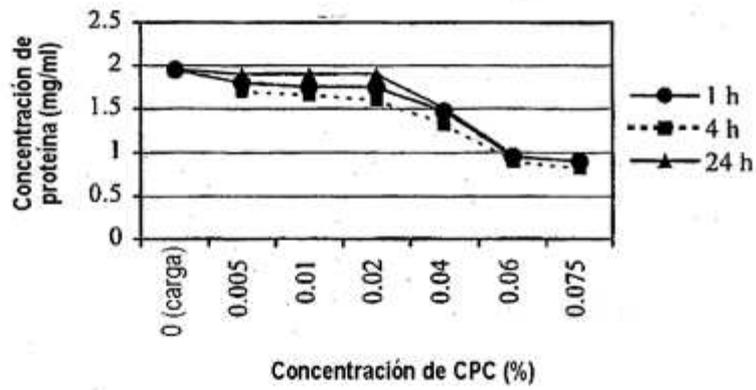


FIG. 1C

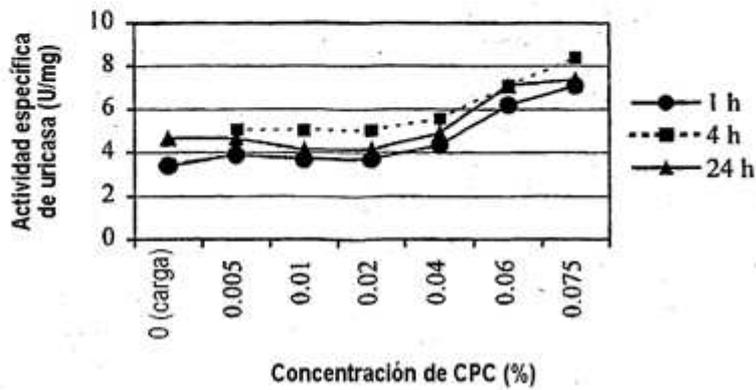
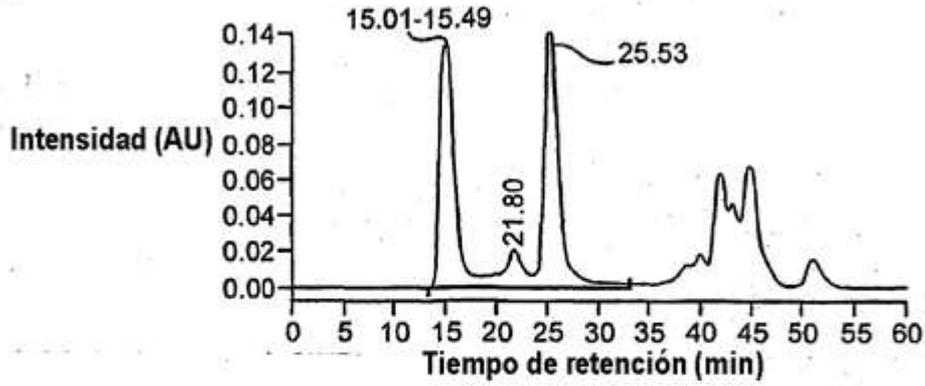
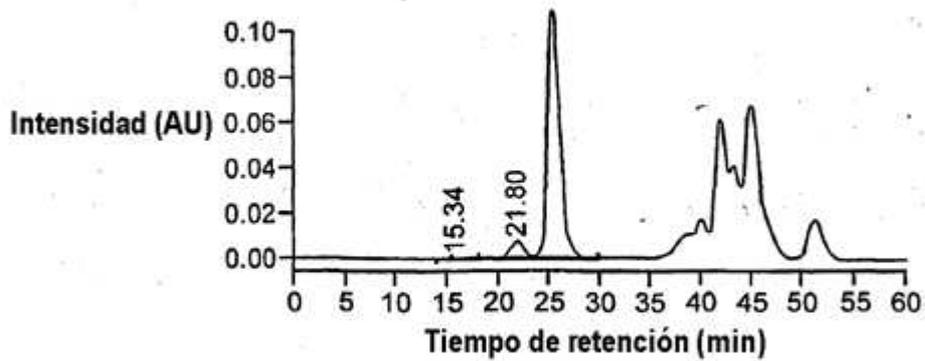


FIG. 2A



N.º	TR	Área	Altura	Cono I	CI
1	15.01	2358734	63671	15.788	FWD
2	15.10	315443	63515	2.111	FWD
3	15.18	438417	62665	2.921	FWD
4	15.30	285062	62077	1.908	FWD
5	15.45	434310	62122	2.907	FWD
6	15.49	2800622	62094	18.746	FWD
7	21.80	1375688	10369	9.208	FWD
8	25.53	6933862	70529	46.411	FWD
		14940138	457042	100.000	

FIG. 2B



N.º	TR	Área	Altura	Cono I	CI
1	15.34	48627	580	0.942	FWD
2	21.80	377396	3941	7.315	FWD
3	25.50	4733378	56069	91.743	FWD
		5159401	60590	100.000	

FIG. 3

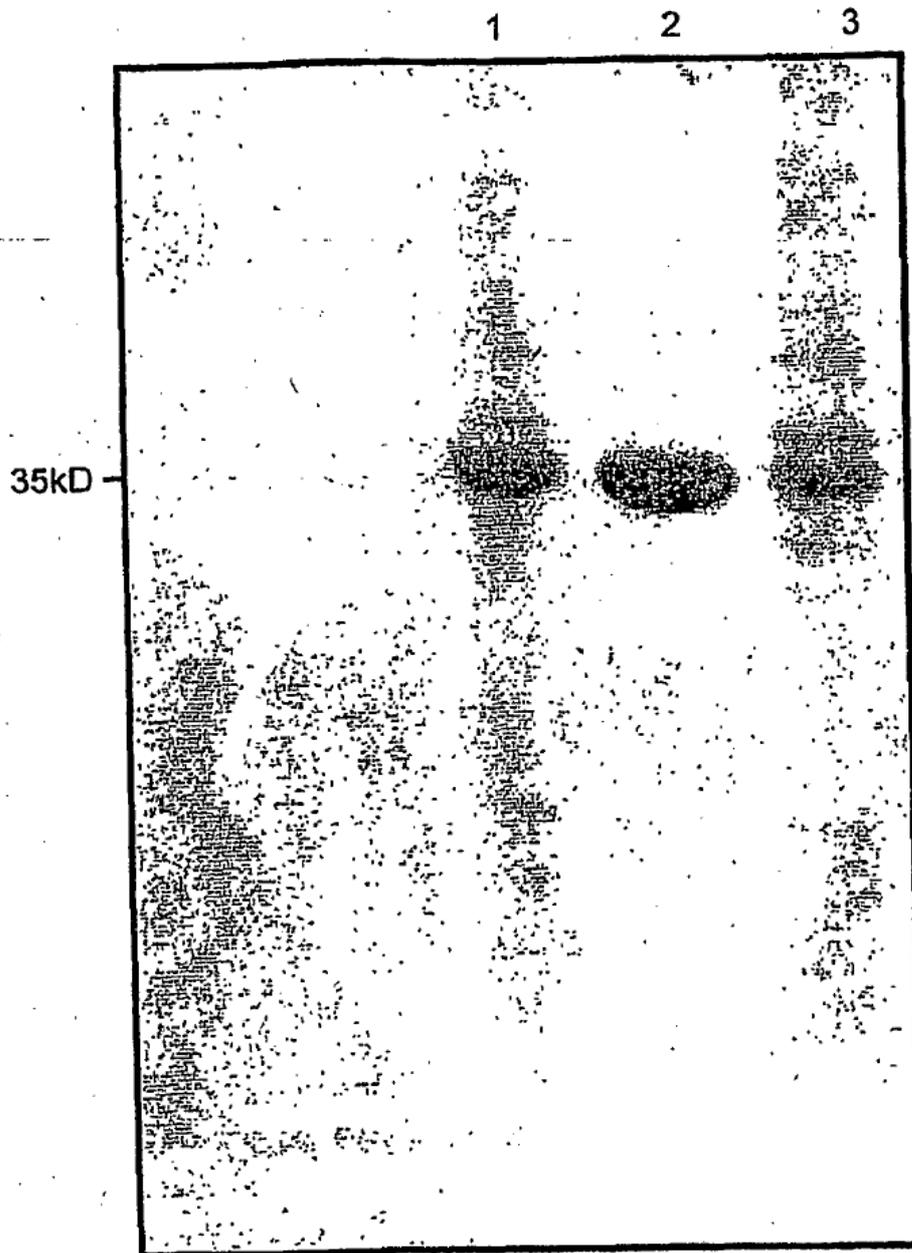
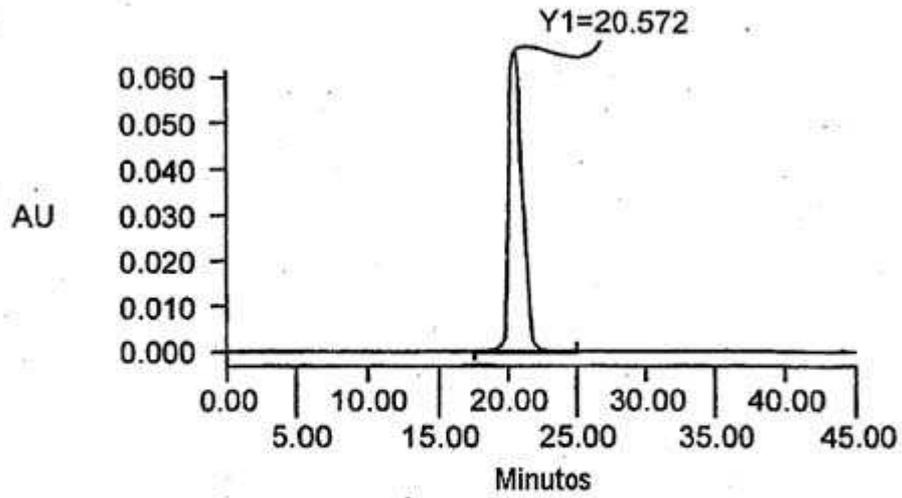
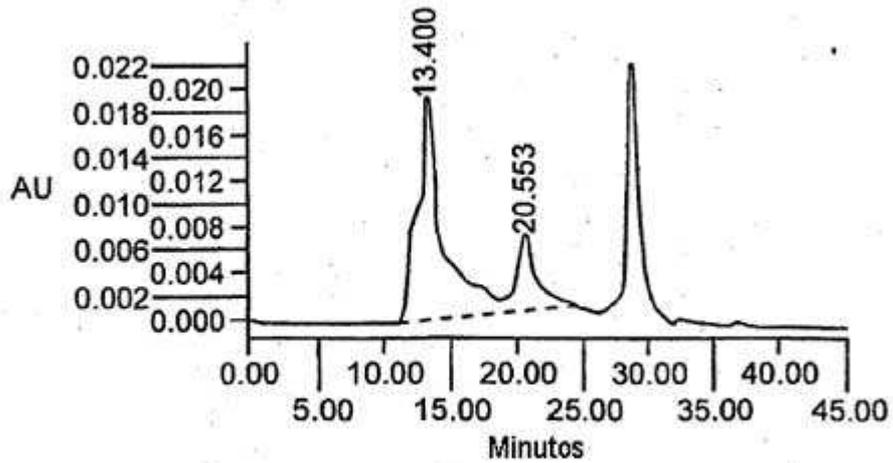


FIG. 4A



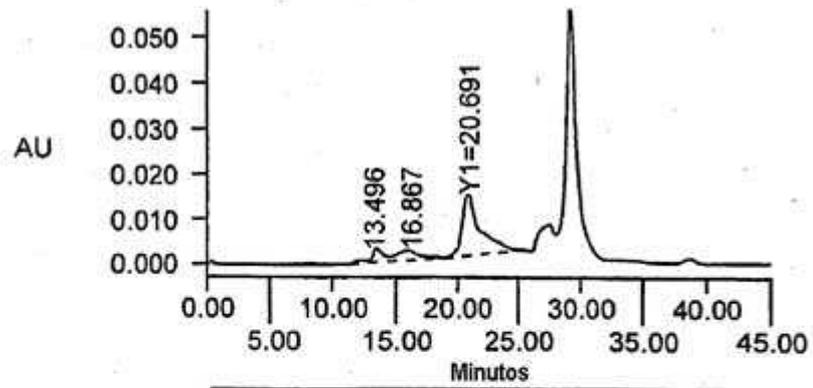
	Nombre de pico	TR	Área	% de área
1	Y1	20.572	4118280	100.00

FIG. 4B



	TR	Área	% de área
1	13.400	2538259	77.31
2	20.553	745048	22.69

FIG. 4C



Nombre de pico	TR	Area	% de área
1	13.498	394554	21.77
2	16.867	42019	2.32
3 Y1	20.691	1375981	15.91

FIG. 5

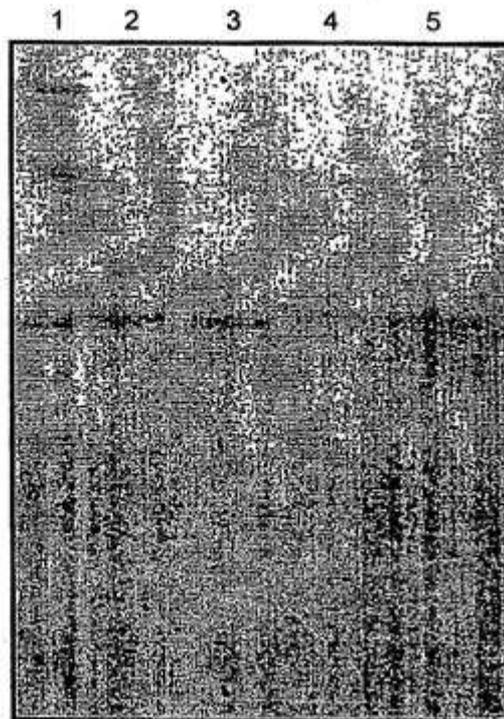


FIG. 6A

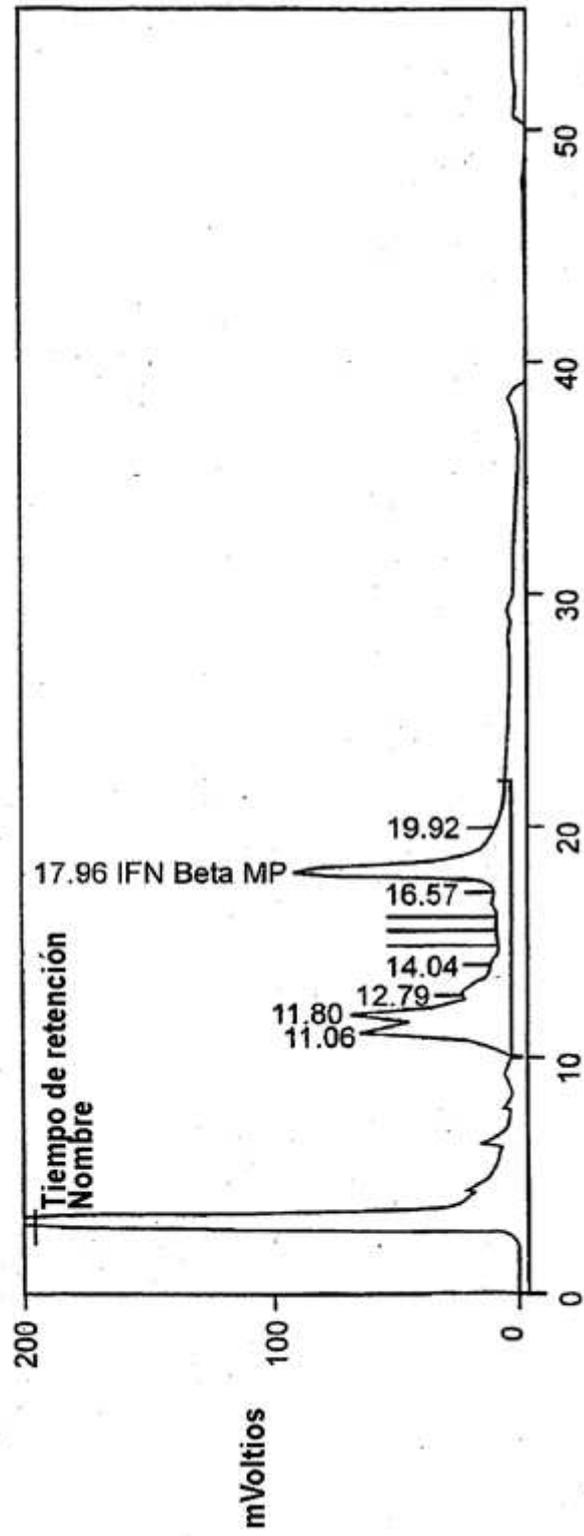


FIG. 6B

