

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 562**

51 Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11721748 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2572190**

54 Título: **Procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba**

30 Prioridad:

27.10.2010 EP 10188972

19.05.2010 EP 10163273

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

24.04.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse, 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FALKENSTEIN, ROBERTO;

FUEHLER, NICOLE y

SMIDA, MARIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 562 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

Procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba

- 5 Se reseña en la presente memoria un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba para la purificación de polipéptidos que comprenden un marcaje de histidina mediante la elución del polipéptido del material cromatográfico con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol.

10 Antecedentes de la invención

10 Las proteínas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos recombinantes son bien conocidos en el estado de la técnica. Los polipéptidos para uso en aplicaciones industriales se producen principalmente en células procarióticas tales como *E. coli* y células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6@ y similares.

15 Para aplicación humana, toda sustancia farmacéutica tiene que satisfacer distintos criterios. Para asegurar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en seres humanos, tienen que retirarse por ejemplo los ácidos nucleicos, virus y proteínas de célula hospedadora, que causarían un grave daño. Para satisfacer los requisitos regulatorios, tienen que seguir al proceso de fabricación una o más etapas de purificación. Entre otros, pureza, producción y rendimiento y desempeñan un papel importante en la determinación del proceso de purificación apropiado.

20 Están bien establecidos diferentes procedimientos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (p.ej. cromatografía de afinidad por proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (p.ej. intercambio catiónico (resinas de sulfopropilo o carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio iónico en modo mixto), adsorción tiófila (p.ej. con β -mercaptoetanol y otros ligandos de SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (p.ej. con fenil-Sepharose, resinas azarenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelato metálico (p.ej. con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar), (véase, p.ej. Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

25 Mateo, C., *et al.* reseñan la cromatografía de afinidad por enzimas marcadas con polihistidina (J. Chrom. 915 (2001) 97-106). En el documento WO 02/37100, se reseñan aplicaciones novedosas de resina de níquel-ácido nitrilotriacético (NI-NTA). Se reseñan procedimientos y kits para purificar proteínas marcadas con his en el documento WO 2005/035092. En el documento WO 98/06739, se reseña un procedimiento para la purificación de proteínas recombinantes.

30 Se reseñan procedimientos de purificación por afinidad que implican miméticos de aminoácidos como agentes de elución en el documento WO 94/07912. En el documento US 2004/0152076, la separación de ácido nucleico usando cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Se reseña un proceso para la purificación de factor VIII en el documento US 6.005.082. En el documento US 2007/0037966, se reseña una purificación por cromatografía de interacción hidrófoba de polipéptidos del factor VII.

35 Sumario de la invención

40 Se ha encontrado que puede recuperarse un polipéptido que comprende un marcaje de histidina de un material de cromatografía de interacción hidrófoba con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol. Con el procedimiento reseñado en la presente memoria, pueden evitarse soluciones de recuperación que comprenden disolventes orgánicos, tales como 2-propanol, sin pérdida de selectividad y rendimiento.

45 Por tanto, se reseña en la presente memoria un procedimiento para obtener o purificar un polipéptido que comprende un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:

- 50
- 55 - aplicar una primera solución que comprende el polipéptido con un marcaje de histidina a un material de cromatografía de interacción hidrófoba, y
 - recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina del material de cromatografía de interacción hidrófoba aplicando una segunda solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol, y obteniendo o purificando así el polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

60 Se reseña también en la presente memoria un procedimiento para producir un polipéptido que comprende un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:

- 65
- cultivar una célula procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un marcaje de histidina,

- recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina de las células y/o el medio de cultivo, opcionalmente en forma de cuerpos de inclusión,
- solubilizar y/o desplegar opcionalmente el polipéptido que comprende un marcaje de histidina,
- purificar el polipéptido solubilizado y/o desplegado que comprende un marcaje de histidina con un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba, produciendo así un polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

En una realización, el material de cromatografía de interacción hidrófoba comprende una matriz de agarosa a la que se han ligado ligandos hidrófobos. En otra realización, el ligando se selecciona de n-, iso- o neo-alkilenglicoles alifáticos u oligoalkilenglicoles. En una realización adicional, el ligando se selecciona de grupos propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, polietilenglicol, y polipropilenglicol. En una realización adicional, el ligando es un ligando de fenilo y la segunda solución en la etapa de recuperación comprende, además del imidazol o derivado de imidazol, 2-propanol.

15 Descripción detallada de la invención

Se reseña en la presente memoria un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba escalable ejecutado en modo de unión y elución para la purificación de polipéptidos que comprenden un marcaje de histidina, en el que la recuperación del polipéptido del material de cromatografía de interacción hidrófoba es con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol tal como histidina. Usando este sistema de elución, puede evitarse la puesta en práctica de tampones de elución que contienen disolventes orgánicos como 2-propanol, sin pérdida de selectividad y rendimiento.

Los términos “aplicar a” y equivalentes gramaticales del mismo designan una etapa parcial de un procedimiento de purificación en que se pone en contacto una solución que contiene una sustancia de interés para purificar con una fase estacionaria. Esto designa que a) la solución se añade a un dispositivo cromatográfico donde está localizada la fase estacionaria, o b) la fase estacionaria se añade a la solución que comprende la sustancia de interés. En el caso a), la solución que contiene la sustancia de interés para purificar pasa a través de la fase estacionaria, permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Dependiendo de las condiciones, tales como por ejemplo pH, conductividad, concentración salina, temperatura y/o caudal, se unen algunas sustancias de la solución a la fase estacionaria, y por tanto se retiran de la solución. Permanecen en solución otras sustancias. Las sustancias que permanecen en solución pueden encontrarse en la circulación. La “circulación” designa la solución obtenida después del paso por el dispositivo cromatográfico independientemente de su origen. Puede ser la solución aplicada que contiene la sustancia de interés o el tampón que se usa para lavar la columna o que se usa para producir la elución de una o más sustancias unidas a la fase estacionaria. En una realización, el dispositivo cromatográfico es una columna o un módulo. La sustancia de interés puede recuperarse de la solución después de la etapa de purificación mediante procedimientos familiares para el especialista en la materia tales como, p.ej., precipitación, desalado, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad o reducción del volumen de disolvente para obtener la sustancia de interés purificada o incluso en forma sustancialmente homogénea. En el caso b), se añade la fase estacionaria, p.ej. en forma de un sólido, a la solución que contiene la sustancia de interés para purificar, permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Después de la interacción, se retira la fase estacionaria, p.ej. por filtración, y la sustancia de interés se une a la fase estacionaria y se retira con la misma de la solución o la sustancia de interés no se une a la fase estacionaria y permanece en solución.

El término “tamponado” como se usa en esta solicitud designa una solución en que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas están compensados por una sustancia tampón. Puede usarse cualquier sustancia tampón que dé como resultado dicho efecto. En una realización, la sustancia tampón se selecciona de ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfina, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o sales del mismo, imidazol o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo. En una realización, la sustancia tampón se selecciona de imidazol o sal del mismo o histidina o sales de la misma. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender también una sal inorgánica adicional. En una realización, la sal inorgánica se selecciona de cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio y citrato de potasio.

Un “polipéptido” es un polímero consistente en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producido natural o sintéticamente. Puede hacerse referencia a los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos como “péptidos”, mientras que puede hacerse referencia a las moléculas consistentes en dos o más polipéptidos, o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos aminoácidos, como “proteínas”. Un polipéptido puede comprender también componentes no aminoácidos tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden añadirse por la célula en que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en la presente memoria en términos de la estructura de su esqueleto aminoácido o del ácido nucleico que codifica el mismo. Las adiciones tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero pueden estar presentes no obstante.

El término "modo de unión y elución" designa un modo de efectuar un procedimiento de purificación por cromatografía. Se aplica en la presente memoria una solución que contiene un polipéptido de interés para purificar a una fase estacionaria, particularmente una fase sólida, interaccionando el polipéptido de interés con la fase estacionaria y reteniéndolo sobre la misma. Las sustancias sin interés se retiran con la circulación o el sobrenadante, respectivamente. El polipéptido de interés se recupera después de la fase estacionaria en una segunda etapa aplicando una solución de elución.

El término "polipéptido en forma monomérica" designa un polipéptido no asociado a una segunda molécula de polipéptido, concretamente que no está unido covalente ni no covalentemente a otra molécula de polipéptido de la misma clase o una clase diferente. El término "polipéptido en forma agregada" designa un polipéptido que está asociado, covalente o no covalentemente, con al menos un polipéptido adicional, y que se eluye en un solo pico de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. El término "en forma monomérica" no designa necesariamente que el 100 % (como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño) de un polipéptido esté presente en forma monomérica. Designa además que un polipéptido está esencialmente en forma monomérica, concretamente al menos un 90 % (determinado por cromatografía de exclusión por tamaño) del polipéptido está en forma monomérica, o al menos un 95 % del polipéptido está en forma monomérica, o al menos un 98 % del polipéptido está en forma monomérica, o al menos un 99 % de polipéptido está en forma monomérica, o particularmente más de un 99 % (determinado por cromatografía de exclusión por tamaño) del polipéptido está en forma monomérica. El término "en forma monomérica y agregada" designa una mezcla de moléculas de polipéptido no asociadas con otras moléculas de polipéptido y moléculas de polipéptido asociadas con otras moléculas de polipéptido. En esta mezcla, no está presente exclusivamente ni la forma monomérica ni la forma agregada.

El término "cuerpo de inclusión" designa una masa intracelular densa de polipéptido de interés agregado que constituye una porción significativa de la proteína celular total, incluyendo todos los componentes celulares de una célula procariótica.

El término "desnaturalizado" designa formas de polipéptidos en la que estos tienen una estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria que no es la nativa. El polipéptido en esta forma no nativa puede ser soluble, pero estar simultáneamente en una conformación biológicamente inactiva. O el polipéptido puede ser insoluble y estar en una conformación biológicamente inactiva, p.ej. con enlaces disulfuro desapareados o no formados. Este polipéptido insoluble puede estar contenido, pero no necesariamente, en cuerpos de inclusión.

El término "replegado" hace referencia a un polipéptido obtenido a partir de una forma desnaturalizada. Típicamente, el objetivo de replegar es producir una proteína que tenga un mayor nivel de actividad del que tendría la proteína si se produjese sin una etapa de replegamiento. Una molécula de proteína plegada es más estable en la conformación que tiene menos energía libre. La mayoría de proteínas hidrosolubles se pliegan de un modo en que la mayoría de los aminoácidos hidrófobos están en la parte interior de la molécula, lejos del agua. Los enlaces débiles que mantienen unida una proteína pueden desestabilizarse mediante una serie de tratamientos que pueden causar que un polipéptido se despliegue, concretamente se desnaturalice. Una proteína plegada es el producto de varios tipos de interacciones entre los aminoácidos mismos y el entorno, incluyendo enlaces iónicos, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro y enlaces covalentes.

El término "desnaturalizado" como se usa en la presente memoria hace referencia a un polipéptido en que se desestabilizan los enlaces iónicos y covalentes e interacciones de van der Waals que existen en la molécula en su estado nativo o replegado. La desnaturalización de un polipéptido puede lograrse, por ejemplo, mediante tratamiento con urea 8 M, agentes reductores tales como mercaptoetanol, calor, pH, temperatura y otros productos químicos. Los reactivos tales como urea 8 M desestabilizan tanto los enlaces de hidrógeno como los enlaces hidrófobos, y si se añade mercaptoetanol también, se reducen los puentes disulfuro (S-S) que se forman entre cisteínas a dos grupos -S-H. El replegamiento de los polipéptidos que contienen ligamientos disulfuro en su estado nativo o replegado puede implicar también la oxidación de los grupos -S-H presentes en los residuos de cisteína para que la proteína vuelva a formar los enlaces disulfuro.

Generalmente, la posición de una cromatografía de interacción hidrófoba es variable en una secuencia de purificación multietapa de un polipéptido.

Los procedimientos para purificar polipéptidos están bien establecidos y se usan ampliamente. Se emplean solos o en combinación. Dichos procedimientos son, por ejemplo, cromatografía de afinidad que usa ligandos de tiol con iones metálicos complejados (p.ej. con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)) o proteínas derivadas de microbios (p.ej., cromatografía de afinidad por proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (p.ej. intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio en modo mixto), adsorción tiófila (p.ej. con β -mercaptoetanol y otros ligandos de SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (p.ej. con fenil-Sepharose, resinas azarenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos preparativos (tales como electroforesis en gel y electroforesis capilar).

El proceso de purificación de inmunoglobulinas comprende en general una parte cromatográfica multietapa. En la primera etapa, se separan los polipéptidos y proteínas no inmunoglobulinas de la fracción de inmunoglobulina mediante una cromatografía de afinidad, p.ej. con proteína A. Después, puede efectuarse una cromatografía de intercambio iónico para dividir las clases de inmunoglobulina individuales y retirar las trazas de proteína A que se han coeluido de la primera columna. Finalmente, es necesaria una tercera etapa cromatográfica para separar los monómeros de inmunoglobulina de los multímeros y fragmentos de la misma clase. A veces, la cantidad de agregados es alta (5 % o más) y no es posible separarlos eficazmente en la tercera etapa de purificación, requiriendo etapas de purificación adicionales.

Se ha encontrado que puede recuperarse un polipéptido que comprende un marcaje de histidina de un material de cromatografía de interacción hidrófoba con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol. Este descubrimiento fue muy sorprendente, ya que imidazol o derivados de imidazol se usan generalmente para recuperar polipéptidos marcados con histidina de materiales de cromatografía de afinidad por metal, pero no de materiales de cromatografía de interacción hidrófoba. Al usar materiales de cromatografía de afinidad por metal, no es posible discriminar entre las formas polipeptídicas plegada correctamente, agregada, plegada parcialmente y no plegada, ya que todas estas formas diferentes comprenden un marcaje de histidina y se unen al material cromatográfico de afinidad por metal. Sin embargo, se ha encontrado que es posible usar un material de cromatografía de interacción hidrófoba para resolver estas formas polipeptídicas estrechamente relacionadas. Al mismo tiempo, este material de cromatografía tiene la suficiente capacidad de unión para separaciones a escala de producción industrial.

Por lo tanto, se reseña en la presente memoria como un primer aspecto un procedimiento para purificar un polipéptido que tiene un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende el polipéptido con un marcaje de histidina a un material de cromatografía de interacción hidrófoba, y
- recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol, y purificar así el polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

Como se usa imidazol o derivado de imidazol para la recuperación del polipéptido unido, la solución que comprende el polipéptido que se aplica al material de cromatografía de interacción hidrófoba está libre de imidazol y de cualquier derivado de imidazol. El polipéptido retenido sobre el material de cromatografía de interacción hidrófoba se recupera con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol. Este procedimiento se ejecuta en modo de unión y elución, concretamente se une en primer lugar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina al material de cromatografía de interacción hidrófoba y después, en una etapa adicional, se recupera del material de cromatografía de interacción hidrófoba. Pueden incluirse etapas de lavado intermitentes en los procedimientos como se reseñan en la presente memoria. En estas etapas de lavado, la solución o soluciones aplicadas están libres de imidazol y derivados de imidazol.

En el procedimiento como se reseña en la presente memoria, todas las soluciones están libres de, concretamente no contienen, imidazol ni un derivado de imidazol, excepto la solución de recuperación del polipéptido que comprende un marcaje de histidina del material de cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización, la solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol es una solución acuosa. En una realización adicional, la solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol no comprende, concretamente está libre de, disolvente orgánico y/o alcohol alifático. En una realización adicional, la solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol consiste en agua, imidazol o un derivado de imidazol, una sustancia tampón y opcionalmente una o dos o tres sales inorgánicas.

El término "imidazol o un derivado de imidazol" designa un compuesto seleccionado de imidazol, imidazol sustituido, histidina y derivados de histidina. En una realización, el imidazol o derivado de imidazol se selecciona de imidazol e histidina.

El material de cromatografía de interacción hidrófoba en una realización comprende una matriz de agarosa a la que se ha ligado covalentemente un ligando hidrófobo. En una realización adicional, el ligando es un ligando n-, iso- o neo-alifático o un oligoligando (alquilenglicol). En una realización adicional, el ligando es un ligando de propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, polietilenglicol o polipropilenglicol. En una realización, el ligando es un ligando de polipropilenglicol. En otra realización, el ligando es un ligando de fenilo y la solución en la etapa de recuperación comprende además 2-propanol.

Los términos "comprende un marcaje de histidina" o "marcado con histidina" designan la presencia de una secuencia consecutiva de residuos de histidina en el extremo C o el extremo N de un polipéptido. El marcaje de histidina puede estar directamente en el extremo respectivo o como máximo a hasta 10 residuos del extremo respectivo. El número de residuos de histidina en un marcaje de histidina es de 3 residuos hasta 10 residuos, concretamente 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 residuos. En una realización, el número de residuos de histidina es de 4 residuos hasta 8 residuos.

65

En una realización de los aspectos que se reseñan en la presente memoria, el procedimiento para purificar u obtener un polipéptido que comprende un marcaje de histidina comprende las siguientes etapas:

- 5 - aplicar una primera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba para producir un material de cromatografía de interacción hidrófoba acondicionado,
- aplicar una segunda solución que comprende el polipéptido que comprende un marcaje de histidina al material de cromatografía de interacción hidrófoba acondicionado,
- aplicar opcionalmente una tercera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba,
- 10 - recuperar y purificar u obtener así el polipéptido con una cuarta solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol del material de cromatografía de interacción hidrófoba.

La primera a tercera soluciones están libres de imidazol y cualquier derivado de imidazol.

15 Los polipéptidos que comprenden un marcaje de histidina pueden producirse recombinantemente en células eucarióticas y procarióticas, tales como células CHO, células HEK y *E. coli*. Si el polipéptido se produce en células procarióticas, se obtiene generalmente en forma de cuerpos de inclusión insolubles. Los cuerpos de inclusión pueden recuperarse fácilmente de la célula procariótica y el medio de cultivo. El polipéptido obtenido en forma insoluble en los cuerpos de inclusión tiene que solubilizarse antes de poder llevar a cabo un procedimiento de purificación y/o plegamiento. Generalmente, la cromatografía de afinidad por metal no es capaz de discriminar
20 entre las formas polipeptídicas correctamente plegada, agregada, parcialmente plegada y desplegada contenidas en una solución, p.ej. obtenida después de solubilización y/o plegamiento. Esto es debido al hecho de que las diferentes formas polipeptídicas comprenden todas un marcaje de histidina que es responsable de la interacción con el material de cromatografía de afinidad por metal. Se ha encontrado que el material de cromatografía de interacción hidrófoba puede separar estas formas polipeptídicas diferentes pero estrechamente relacionadas cuando se emplea
25 una solución que contiene imidazol o derivado de imidazol para la recuperación. Este descubrimiento era absolutamente inesperado, ya que imidazol y derivados de imidazol se usan generalmente para recuperar polipéptidos que comprenden un marcaje de histidina de materiales de cromatografía quelantes. El control con un polipéptido que carece de marcaje de histidina mostró que el efecto de la recuperación inducida por imidazol era específico del polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

30 Por tanto, es un segundo aspecto como se reseña en la presente memoria un procedimiento para producir un polipéptido que comprende un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:

- 35 - cultivar una célula procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un marcaje de histidina,
- recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina de las células procarióticas o eucarióticas y/o el medio de cultivo, opcionalmente en forma de cuerpos de inclusión en el caso de células procarióticas,
- solubilizar y/o plegar opcionalmente el polipéptido que comprende un marcaje de histidina,
- 40 - purificar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba como se reseña en la presente memoria y producir así un polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

En una realización, el procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba comprende las siguientes etapas:

- 45 - aplicar una primera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba para producir un material de cromatografía de interacción hidrófoba acondicionado,
- aplicar una segunda solución que comprende un polipéptido que comprende un marcaje de histidina al material de cromatografía de interacción hidrófoba acondicionado,
- aplicar opcionalmente una tercera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba,
- 50 - recuperar y obtener así el polipéptido con una cuarta solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol del material de cromatografía de interacción hidrófoba,

estando la primera a tercera soluciones libres de imidazol y derivados de imidazol.

55 A continuación, se presentan realizaciones diferentes de todos los aspectos como se reseñan anteriormente.

En una realización, la primera solución comprende una primera sustancia tampón, la segunda solución comprende una segunda sustancia tampón, la tercera solución comprende una tercera sustancia tampón y la cuarta solución comprende una cuarta sustancia tampón, siendo la cuarta sustancia tampón imidazol o un derivado de imidazol, con
60 la condición de que al menos la segunda sustancia tampón y la tercera sustancia tampón y la cuarta sustancia tampón sean todas sustancias tampón diferentes. En una realización, la primera solución y/o la segunda solución y/o la tercera solución están libres de imidazol y derivados de imidazol. En otra realización, la aplicación de la primera solución es de 3 a 20 volúmenes de columna. En otra realización, la aplicación de la primera solución es de 3 a 10 volúmenes de columna. En una realización, la aplicación de la segunda solución es de 1 a 10 volúmenes de columna. En otra realización, la aplicación de la tercera solución es de 1 a 10 volúmenes de columna.

El material de cromatografía de interacción hidrófoba se acondiciona en la primera etapa con una solución tamponada. Esta solución no comprende imidazol ni un derivado de imidazol. La sustancia tampón de la primera solución tampón de acondicionamiento puede ser la misma o diferente que la sustancia tampón de la segunda solución que comprende el polipéptido que comprende un marcaje de histidina.

Después de ello, se aplica una segunda solución que comprende el polipéptido que comprende el marcaje de histidina al material de cromatografía de interacción hidrófoba acondicionado. En esta etapa, se retiene el polipéptido que comprende el marcaje de histidina sobre el material de cromatografía de interacción hidrófoba. Esta solución no comprende imidazol ni un derivado de imidazol. La sustancia tampón de la carga, concretamente la segunda solución tampón, puede ser igual o diferente que la sustancia tampón de la tercera solución.

Después de la carga del material de cromatografía con el polipéptido que comprende un marcaje de histidina, puede aplicarse opcionalmente una solución de lavado, concretamente la tercera, al material de cromatografía de interacción hidrófoba cargado. Esta solución no comprende imidazol ni derivados de imidazol.

Finalmente, para la recuperación del polipéptido que comprende un marcaje de histidina del material de cromatografía de interacción hidrófoba, se aplica al material de cromatografía una solución de recuperación, concretamente la cuarta, que comprende imidazol o un derivado de imidazol.

En una realización, el procedimiento para purificar u obtener un polipéptido que comprende un marcaje de histidina es un procedimiento de cromatografía en columna.

El volumen aplicado al material de cromatografía de interacción hidrófoba en las diferentes etapas es independientemente entre sí de 3 a 20 volúmenes de columna, en una realización de 4 a 10 volúmenes de columna. En una realización, la conductividad de la primera solución es mayor o igual a la conductividad de la segunda solución que comprende un polipéptido que comprende un marcaje de histidina y/o la conductividad de la tercera solución y/o la conductividad de la cuarta solución.

El valor de pH de las soluciones en el procedimiento como se reseña en la presente memoria es de pH 5 a pH 8. El procedimiento como se reseña en la presente memoria se ejemplifica en los ejemplos con un conjugado de factor de crecimiento de tipo insulina 1 y un marcaje de histidina. Se reseña la preparación del mismo, p.ej. en el documento WO 2008/025527 (incorporado a la presente memoria como referencia). Este dato se presenta solamente para ejemplificar el procedimiento actual y no ha de tratarse como una limitación de la invención actual.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance está expuesto en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de imidazol 20 mM por un gradiente lineal de 100 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 2 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de imidazol 20 mM por un gradiente lineal de 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 3 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de imidazol 20 mM por elución por etapas de 100 % de tampón de elución; imagen pequeña: HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 4 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de histidina 100 mM por un gradiente lineal de 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 5 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de histidina 20 mM por un gradiente lineal de 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna; imagen pequeña: HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 6 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de butilo) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de imidazol 20 mM por un gradiente lineal de 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de la fracción de pico.

Figura 7 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) con elución de tampón fosfato de potasio 20 mM por un gradiente lineal de 50 % de tampón de

elución en 10 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de la fracción de circulación.

Figura 8 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de fenilo) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de imidazol 5 mM por un gradiente lineal de 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de una fracción de pico.

Figura 9 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de cloruro de sodio 1,5 M por un gradiente lineal de 100 % de tampón de elución en 30 volúmenes de columna; imagen pequeña: cromatograma de HPLC analítica de las fracciones de pico combinadas.

Figura 10 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución con imidazol 20 mM por un gradiente lineal de 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna.

Figura 11 Cromatograma de elución del material de interacción hidrófoba total (ligando de polipropilenglicol) para un procedimiento como se reseña en la presente memoria, con elución de tampón de fosfato de potasio 20 mM por un gradiente lineal de 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna.

Ejemplo 1

Material y procedimientos:

Si no se indica otra cosa, los diferentes procedimientos de cromatografía se han efectuado según el manual del fabricante de material de cromatografía.

Técnicas de ADN recombinante:

Se usaron procedimientos estándares para manipular ADN como se describen en Sambrook, J., *et al.*, "Molecular cloning: A laboratory manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos de biología molecular según las instrucciones del fabricante.

Determinación de proteína:

Se determinó la concentración de proteína determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm con una longitud de onda de referencia de 320 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia aminoacídica.

Exclusión por tamaño-HPLC:

Se realizó la cromatografía con una columna Tosoh Haas TSK 3000 SWXL en un sistema ASI-100 HPLC (Dionex, Idstein, Alemania). Se monitorizaron los picos de elución a 280 nm por un detector de fila de diodos UV (Dionex). Después de la disolución de las muestras concentradas a 1 mg/ml, se lavó la columna con un tampón que consistía en dihidrogenofosfato de potasio 200 mM y cloruro de potasio 250 mM a pH 7,0 hasta alcanzar un valor de referencia estable. Se efectuaron las tandas de análisis en condiciones isocráticas usando un caudal de 0,5 ml/min durante 30 min a temperatura ambiente. Se integraron manualmente los cromatogramas con Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania).

HPLC en fase inversa (HPLC-FI):

Se analiza la pureza por HPLC-FI. Se efectúa el ensayo en una columna Phenomenex C18 usando un gradiente de acetonitrilo/TFA acuoso. Se monitoriza el perfil de elución como absorbancia UV a 215 nm. Se calculan los porcentajes de sustancias eluidas basándose en el área de pico total de las proteínas eluidas.

Sistema umbral de ADN:

Véase, p.ej. Merrick, H. y Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403.

Determinación de proteína de célula hospedadora:

Se recubren las paredes de los pocillos de una placa de microvaloración con una mezcla de seroalbúmina y estreptavidina. Se une un anticuerpo policlonal derivado de cabra contra HCP a las paredes de los pocillos de la placa de microvaloración. Después de una etapa de lavado, se incuban diferentes pocillos de la placa de microvaloración con una secuencia de calibración de HCP de diferentes concentraciones y solución de muestra. Después de la incubación, se retira el material de muestra no unido por lavado con solución tampón. Para la detección, se incuban los pocillos con un conjugado de anticuerpo-peroxidasa para detectar la proteína de célula hospedadora unida. Se detecta la actividad peroxidasa fijada por incubación con ABTS y detección a 405 nm.

Determinación de ADN:

5 Se unió biotina a una placa de microvaloración. Se añadió una mezcla de reacción de estreptavidina, ADN monocatenario y proteína de unión a ADN monocatenario biotinilada. La proteína de unión era capaz de unirse a ADN y estaba biotinilada. De esta manera, era posible retirar específicamente el ADN de la mezcla de reacción. La estreptavidina se unió a la biotina sobre la placa de microvaloración así como a la biotina que estaba acoplada a la proteína de unión a ADN monocatenario. Se añadió a este complejo total un anticuerpo específico de ADN que estaba acoplado a ureasa. La adición de urea dio como resultado la hidrólisis de la urea, lo que causó un cambio local del pH. Este cambio puede detectarse como un potencial de superficie alterado. El cambio en el potencial de superficie era proporcional a la cantidad de ADN unido. Se obtuvo ADN monocatenario mediante digestión con proteinasa K y desnaturalización con SDS.

15 Procedimiento general para el aislamiento, solubilización y replegamiento de polipéptido de cuerpos de inclusión:

Además del procedimiento efectuado en la bibliografía citada, puede efectuarse la preparación de cuerpos de inclusión, p.ej. según el procedimiento de Rudolph *et al.* (Rudolph, R., *et al.*, "Folding Proteins", en: T.E. Creighton (ed.): "Protein function: A Practical Approach", 57-99 (1997)). Se almacenaron los cuerpos de inclusión a -70 °C. La solubilización de los cuerpos de inclusión puede efectuarse igualmente según el procedimiento de Rudolph *et al.* (Rudolph, R., *et al.*, "Folding Proteins", en: T.E. Creighton (ed.): "Protein function: A Practical Approach" (1997) 57-99).

Ejemplo 2

25 Purificación de IGF-I marcado con histidina sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con imidazol

resina:	TOYOPEARL® polipropilenglicol-600; TOYOPEARL® PPG-600M (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
30 carga:	a) 118 mg de polipéptido b) 1034 mg de polipéptido c) 1034 mg de polipéptido
dimensiones de columna:	a) 13 cm de altura, 11 ml de volumen de lecho b) 22 cm de altura, 108 ml de volumen de lecho c) 22 cm de altura, 108 ml de lecho
35 tampón de equilibrado/primer solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
tampón de lavado 1/segunda solución:	TRIS-HCl 1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,5
tampón de lavado 2/tercera solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
tampón de elución/cuarta solución:	imidazol 20 mM, pH 9,7
40 procedimiento de elución:	a) gradiente lineal hasta 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna b) gradiente lineal hasta 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna c) elución por etapas con 100 % de tampón de elución

45 Resultado:

Como puede observarse en las Figuras 1 a 3, con cualquiera de los tres procedimientos de elución empleados, la molécula de IGF-I marcada con histidina puede recuperarse del material de cromatografía de interacción hidrófoba de polipropilenglicol.

Ejemplo 3

55 Purificación de IGF-I marcado con histidina sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con histidina

resina:	TOYOPEARL® polipropilenglicol-600; TOYOPEARL® PPG-600M (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
carga:	123 mg de polipéptido
60 dimensiones de columna:	13 cm de altura, 11 ml de volumen de lecho
tampón de equilibrado/primer solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
tampón de lavado 1/segunda solución:	TRIS-HCl 1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,5
tampón de lavado 2/tercera solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
tampón de elución/cuarta solución:	a) histidina 100 mM, pH 9,7 b) histidina 20 mM, pH 9,7

ES 2 534 562 T3

procedimiento de elución: gradiente lineal a 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna.

Resultado:

5 Como puede observarse en las Figuras 4 y 5, con cualquiera de las dos soluciones de elución empleadas, puede recuperarse la molécula de IGF-I marcada con histidina del material de cromatografía de interacción hidrófoba de polipropilenglicol.

10 Ejemplo 4

Purificación de IGF-I marcado con histidina sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con imidazol

15 resina: Capto™ Butyl (GE Healthcare, Uppsala, Suecia)
carga: 104 mg de polipéptido
dimensiones de columna: 13,5 cm de altura, 10,7 ml de volumen de lecho
tampón de equilibrado/primer solución: KH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
20 tampón de lavado 1/segunda solución: TRIS-HCl 1 M, NaCl 0,35 M, ácido cítrico 20 mM, pH 3,5
tampón de lavado 2/tercera solución: KH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
tampón de elución/cuarta solución: imidazol 20 mM, pH 9,7
procedimiento de elución: gradiente lineal hasta 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna.

25 Resultado:

Como puede observarse en la Figura 6, puede recuperarse el IGF-I marcado con histidina con el tampón de elución del material de cromatografía de interacción hidrófoba de butilo.

30 Ejemplo 5

Ejemplo comparativo- purificación de IGF-I marcado con histidina sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con fosfato

35 resina: TOYOPEARL® Ether-650M (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
carga: 102 mg de polipéptido
tampón de equilibrado/primer solución: KH_2PO_4 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0
tampón de lavado 1/segunda solución: KH_2PO_4 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0
40 tampón de elución/cuarta solución: KH_2PO_4 20 mM, pH 7,0
procedimiento de elución: gradiente lineal hasta 100 % de tampón de elución.

Resultado:

45 Como puede observarse en la Figura 7, no puede recuperarse la molécula de IGF-I marcada con histidina del material de cromatografía de interacción hidrófoba de éter solamente con un tampón que contiene fosfato.

Ejemplo 6

50 Ejemplo comparativo- purificación de IGF-I marcado con histidina sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con diferente elución

resina: a) Phenyl Sepharose™ (GE Healthcare, Uppsala, Suecia)
b) TOYOPEARL® PPG-600M (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
carga: 80 mg de polipéptido
55 dimensiones de columna: 14 cm de altura, 11 ml de volumen de lecho
tampón de equilibrado/primer solución: a) KH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
b) KH_2PO_4 20 mM, NaCl 1,5 M, pH 3,5
tampón de lavado 1/segunda solución: a) TRIS-HCl, NaCl 0,35 M, ácido cítrico 20 mM, pH 3,5
b) -
60 tampón de lavado 2/tercera solución: a) KH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
b) KH_2PO_4 20 mM, NaCl 1,5 M, pH 3,5
tampón de elución/cuarta solución: a) imidazol 5 mM, 2-propanol al 20 % (v/v), pH 7,0
b) NaCl 1,5 M, 2-propanol al 20 % (v/v), pH 3,5
procedimiento de elución: a) gradiente lineal hasta 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna

65

b) gradiente lineal hasta 100 % de tampón de elución en 30 volúmenes de columna.

Resultado:

5 Como puede observarse en la Figura 8, puede recuperarse el IGF-I marcado con histidina con un tampón de elución que contiene imidazol y 2-propanol del material de cromatografía de interacción hidrófoba fenil-Sepharose™ en un pico estrecho. Esto no puede conseguirse con un tampón de elución libre de imidazol (véase la Figura 9).

10 Ejemplo 7

Ejemplo comparativo- purificación de IGF-I marcado con histidina sobre un material de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con imidazol

15	resina:	Capto™ Phenyl (GE Healthcare, Uppsala, Suecia)
	carga:	117 mg de polipéptido
	dimensiones de columna:	13,5 cm de altura, 10,7 ml de volumen de lecho
	tampón de equilibrado/primer solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
	tampón de lavado 1/segunda solución:	TRIS-HCl 1 M, NaCl 0,35 M, ácido cítrico 20 mM, pH 3,5
20	tampón de lavado 2/tercera solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
	tampón de elución/cuarta solución:	imidazol 20 mM, pH 9,7
	procedimiento de elución:	gradiente lineal hasta 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna

25 Resultado:

Como puede observarse en la Figura 10, no puede recuperarse el IGF-I marcado con histidina con el tampón de elución del material de cromatografía de interacción hidrófoba de fenilo.

30 Ejemplo 8

Ejemplo comparativo- purificación de Herceptin® sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con elución con imidazol

35 Se ajusta el sobrenadante de cultivo a pH 3,5 y una concentración de NaCl de 0,8 mol/l y se filtra a través de un filtro Sartobran P antes de aplicación al material de cromatografía de interacción hidrófoba

40	resina:	TOYOPEARL® polipropilenglicol-600; TOYOPEARL® PPG-600M (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
	carga:	189 mg de polipéptido
	dimensiones de columna:	16 cm de altura, 12,6 ml de volumen de lecho
	tampón de equilibrado/primer solución:	KH ₂ PO ₄ 20 mM, NaCl 0,8 M, pH 3,5
	tampón de lavado 1/segunda solución:	TRIS-HCl 1 M, NaCl 0,35 M, ácido cítrico 20 mM, pH 3,5
45	tampón de elución/cuarta solución:	a) imidazol 20 mM, pH 9,7 b) KH ₂ PO ₄ 20 mM, pH 8,9
	procedimiento de elución:	a) gradiente lineal hasta 50 % de tampón de elución en 10 volúmenes de columna b) gradiente lineal hasta 100 % de tampón de elución en 20 volúmenes de columna.

50 Resultado:

55 Puede encontrarse una fracción de Herceptin® en la circulación por elución con imidazol. Puede recuperarse una fracción adicional de la columna como un pico pequeño al inicio de la elución. En contraposición con esto, como se muestra en la Figura 11, mediante elución con una solución tamponada con fosfato, puede obtenerse Herceptin® como un pico estrecho.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para purificar un polipéptido que comprende un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:
- aplicar una solución que comprende el polipéptido con un marcaje de histidina a un material de cromatografía de interacción hidrófoba, y
 - recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol del material de interacción hidrófoba y purificar así el polipéptido que comprende un marcaje de histidina.
- 10 2. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende un marcaje de histidina que comprende las siguientes etapas:
- cultivar una célula procariótica o eucariótica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un marcaje de histidina,
 - recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina de las células y/o el medio de cultivo,
 - purificar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba que comprende las siguientes etapas:
 - aplicar una solución que comprende el polipéptido con un marcaje de histidina a un material de cromatografía de interacción hidrófoba, y
 - recuperar el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con una solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol del material de cromatografía de interacción hidrófoba y producir así un polipéptido que comprende un marcaje de histidina.
- 15 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el material de cromatografía de interacción hidrófoba comprende una matriz de agarosa a la que se ha ligado un ligando hidrófobo.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el ligando es un ligando de propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, polietilenglicol o polipropilenglicol.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el ligando es un ligando de fenilo y la solución en la etapa de recuperación comprende además 2-propanol.
- 30 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las siguientes etapas:
- aplicar una primera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba,
 - aplicar una segunda solución que comprende un polipéptido que comprende un marcaje de histidina a un material de cromatografía de interacción hidrófoba, y
 - recuperar y producir o purificar así el polipéptido que comprende un marcaje de histidina con una cuarta solución que comprende imidazol o un derivado de imidazol,
- 35 comprendiendo la primera solución una primera sustancia tampón, comprendiendo la segunda solución una segunda sustancia tampón y comprendiendo la cuarta solución una cuarta sustancia tampón, en el que la cuarta sustancia tampón es imidazol o un derivado de imidazol, y en el que la segunda sustancia tampón y la cuarta sustancia tampón son sustancias tampón diferentes.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende, después de aplicar la segunda solución y antes de recuperar, la siguiente etapa:
- aplicar una tercera solución al material de cromatografía de interacción hidrófoba,
- 45 comprendiendo la tercera solución una tercera sustancia tampón, siendo la segunda sustancia tampón y la tercera sustancia tampón y la cuarta sustancia tampón todas sustancias tampón diferentes.
- 50
- 55

Fig. 1

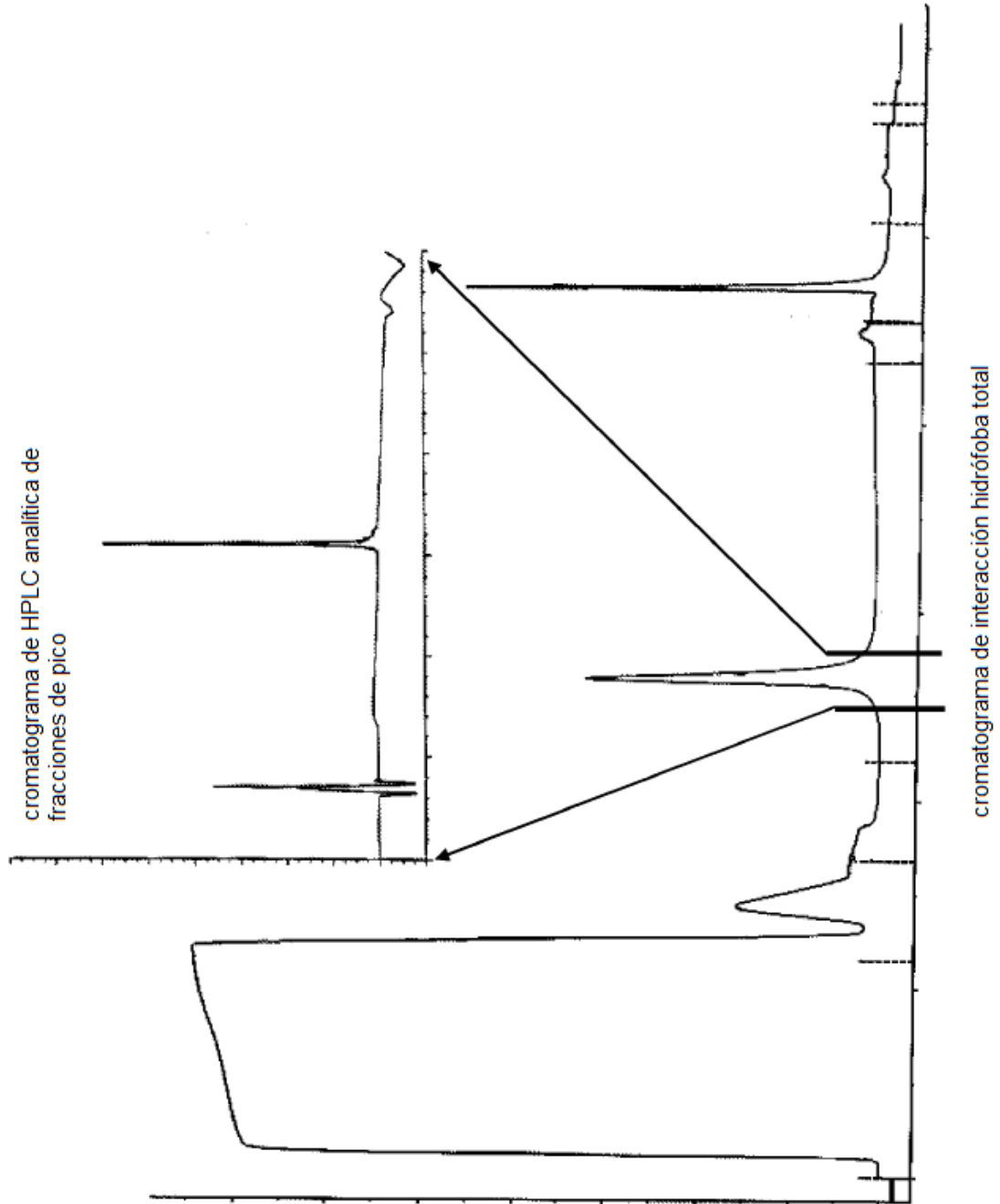


Fig. 2

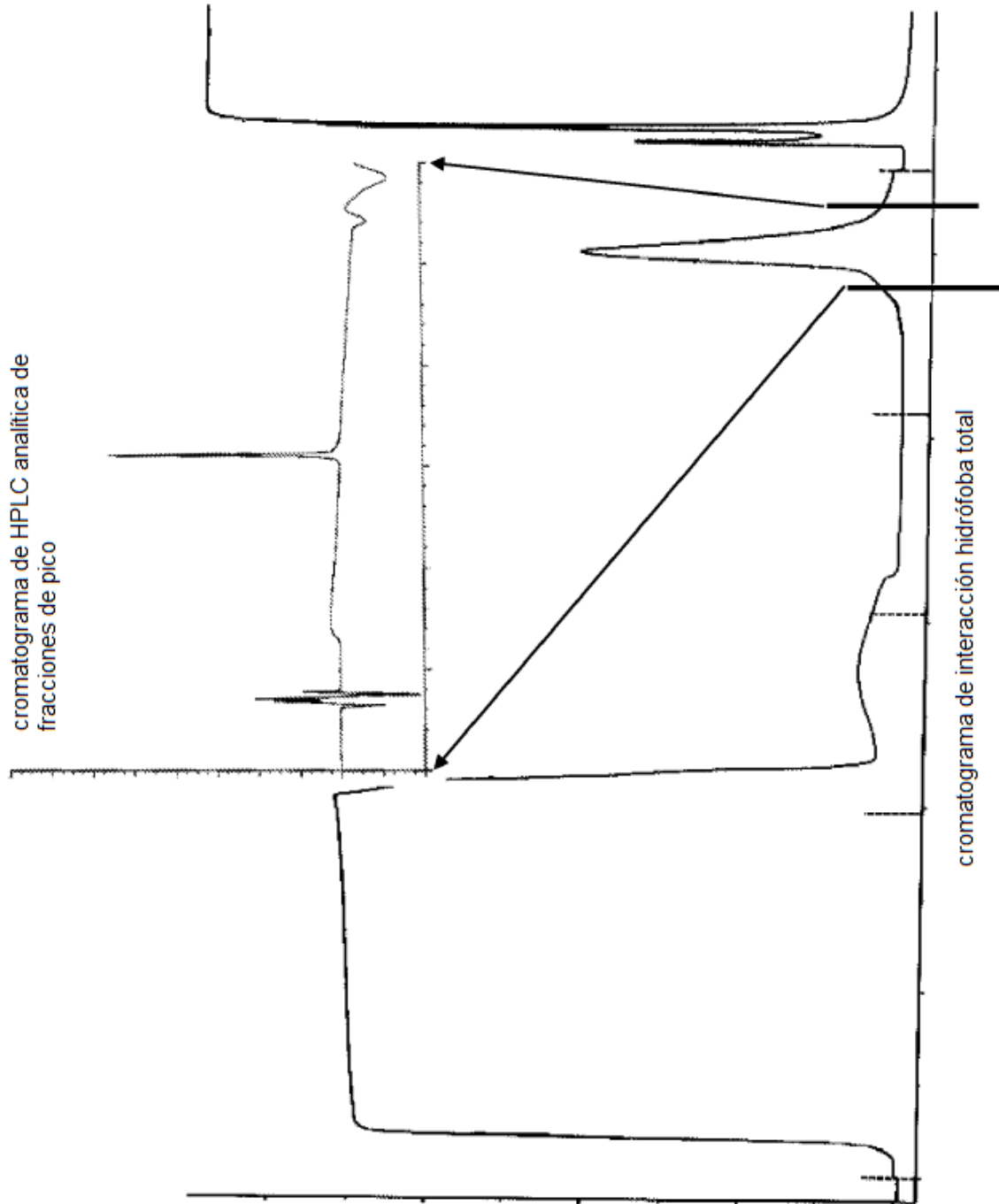


Fig. 3

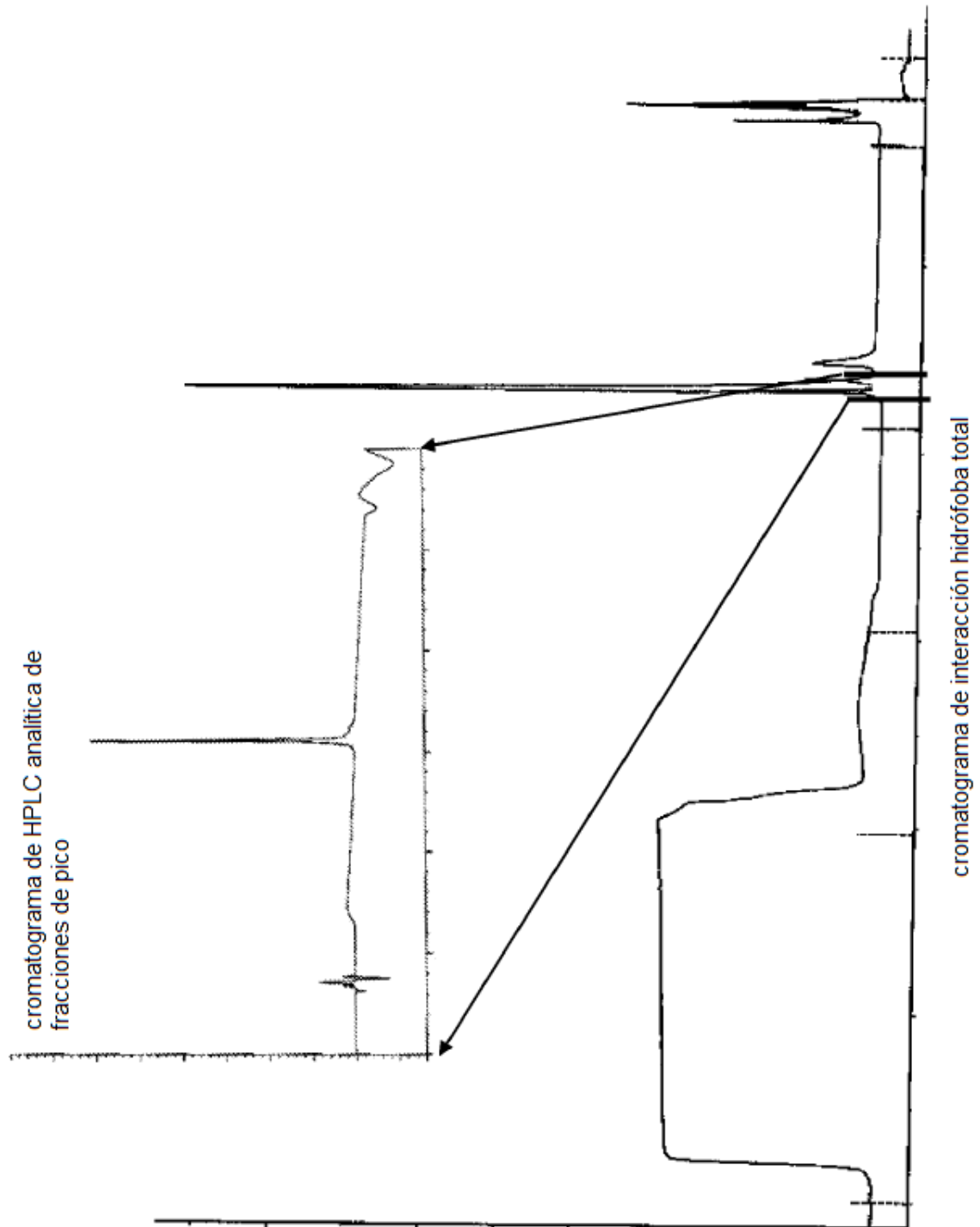


Fig. 4

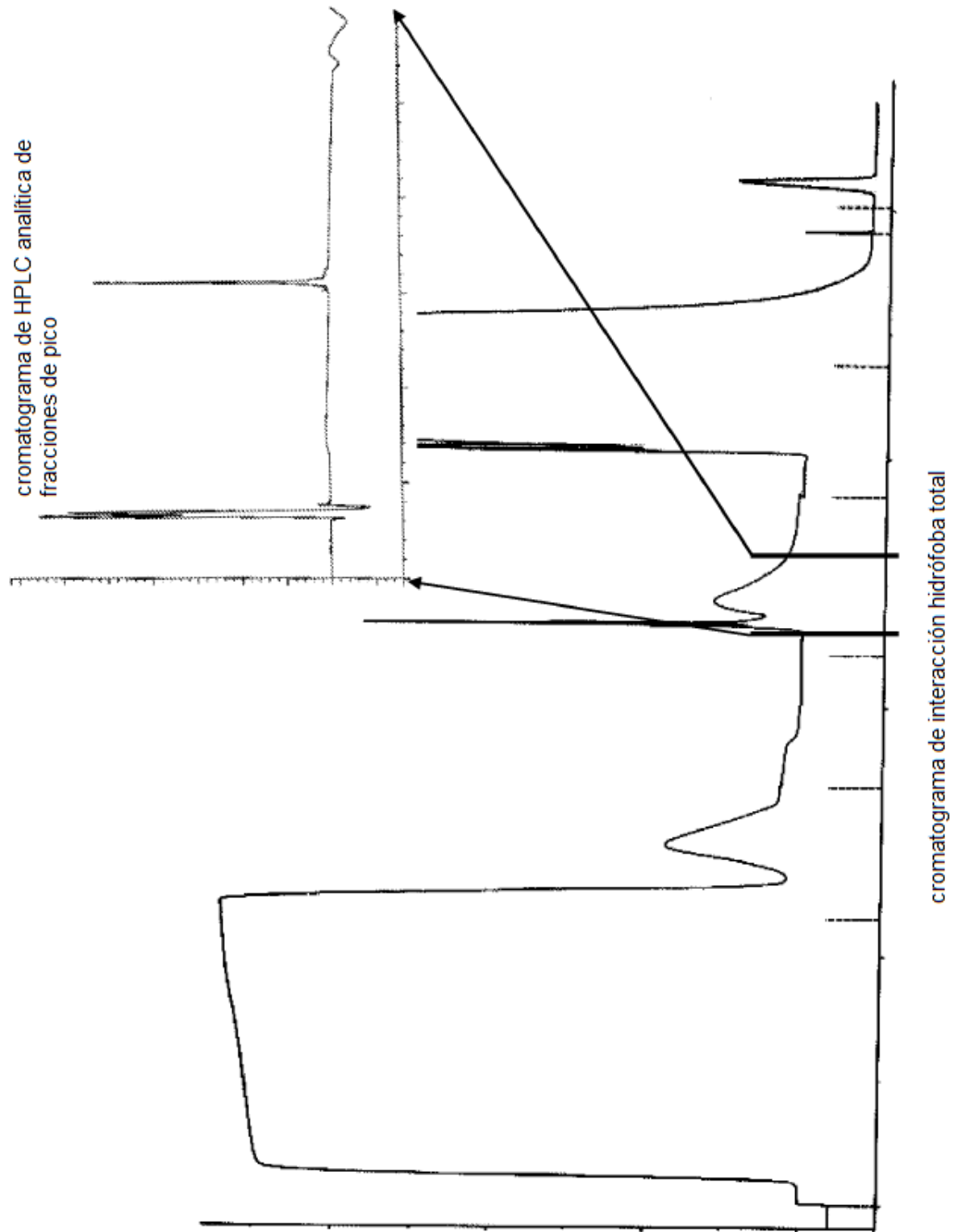


Fig. 5

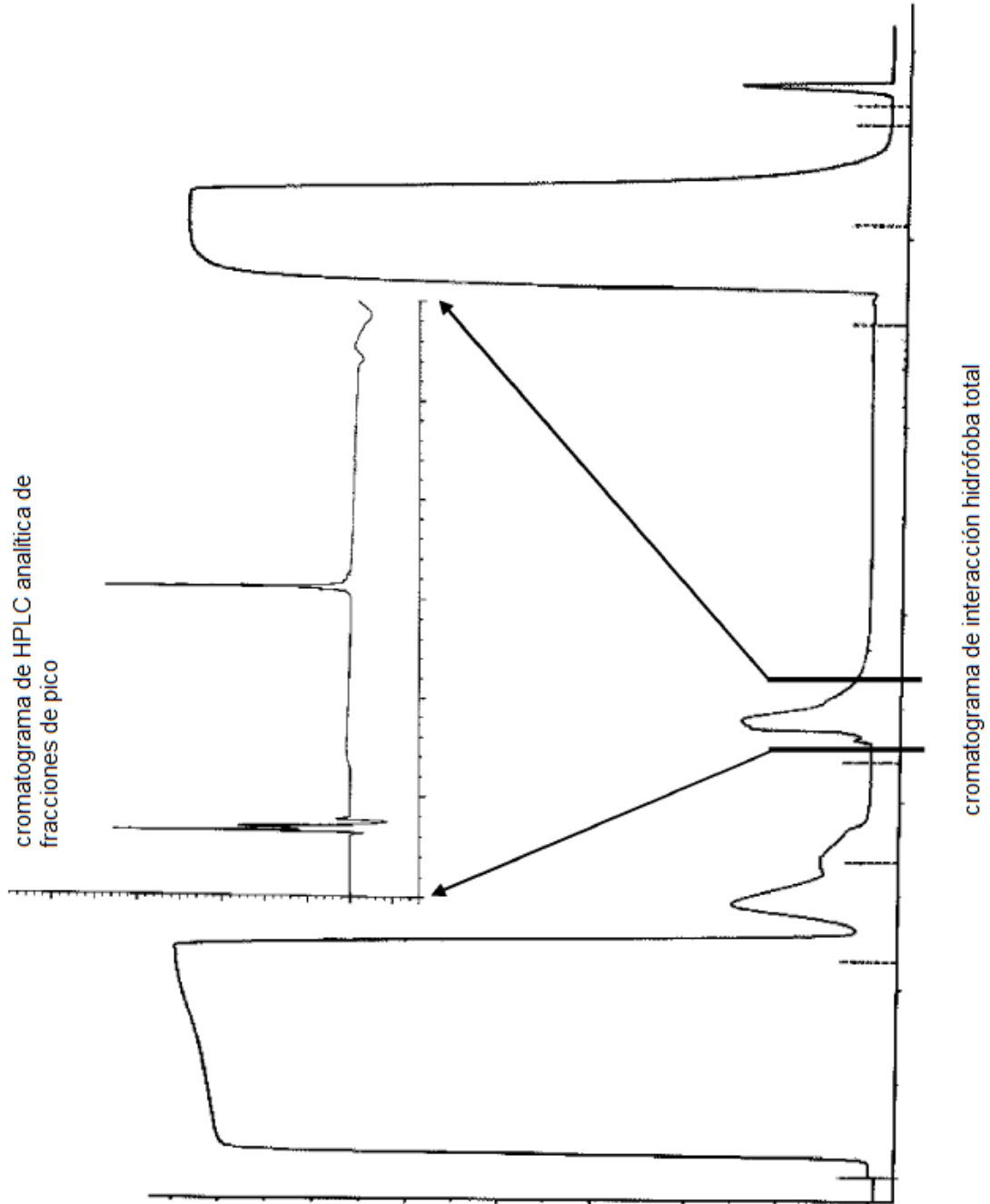


Fig. 6

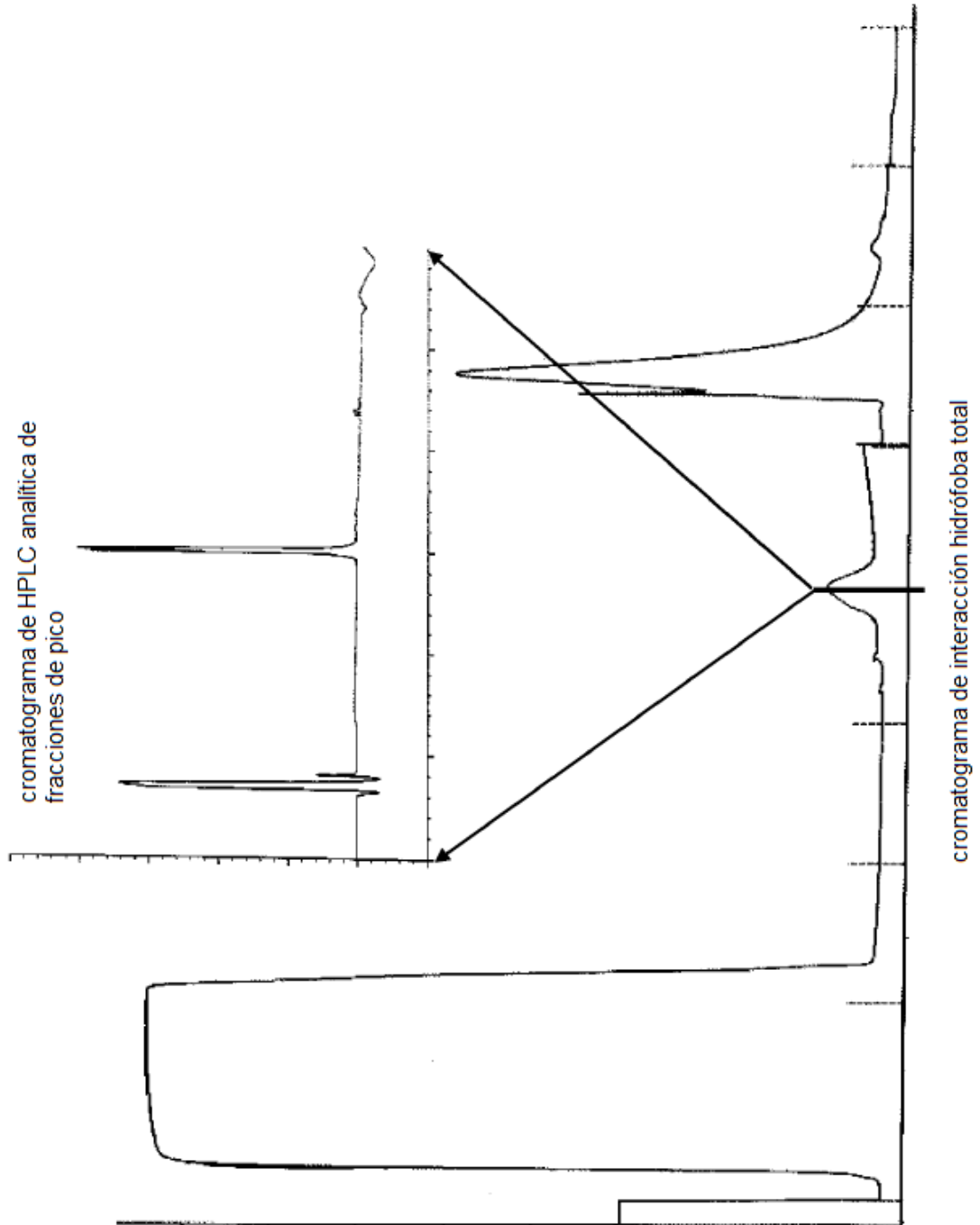


Fig. 7

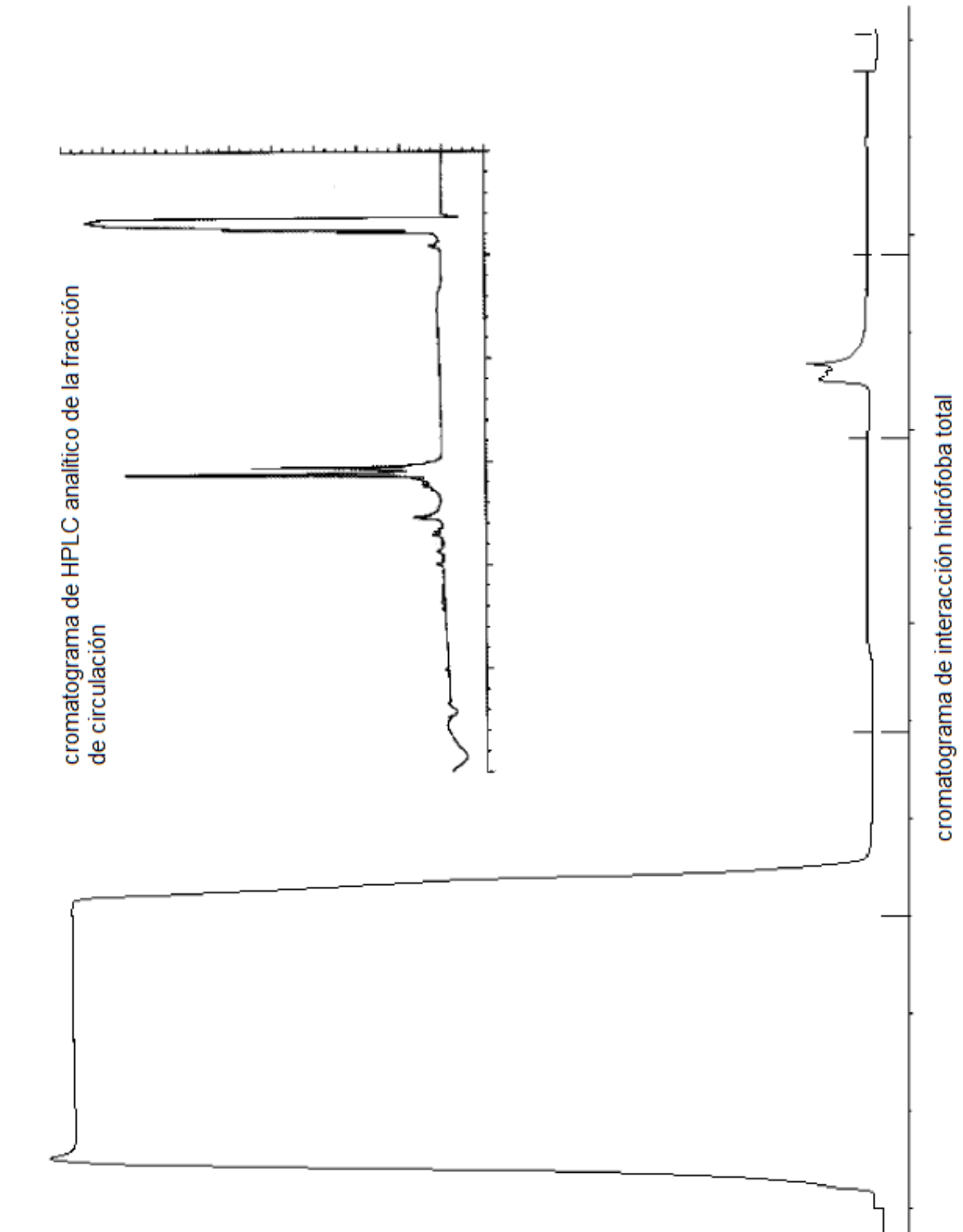


Fig. 8

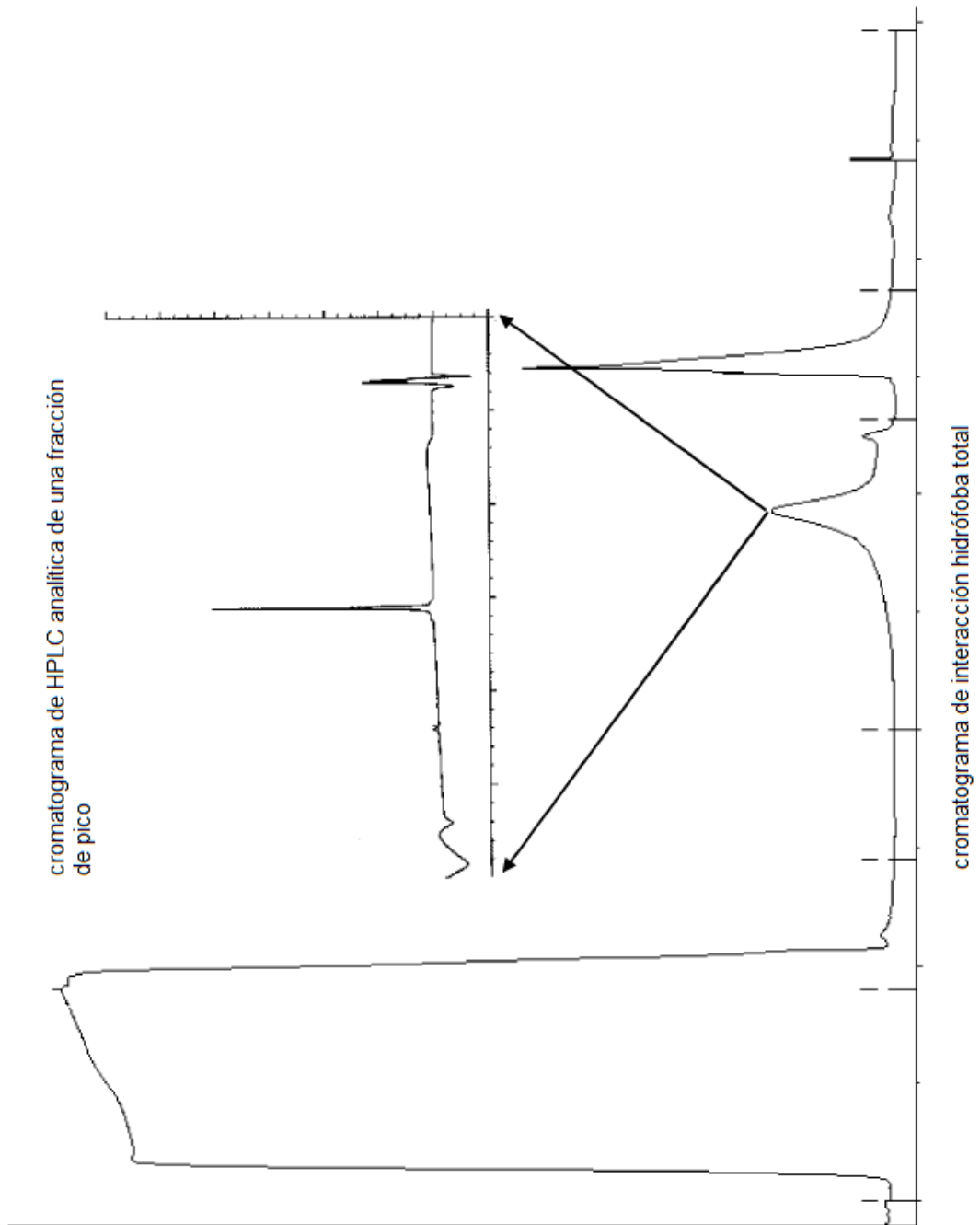


Fig. 9

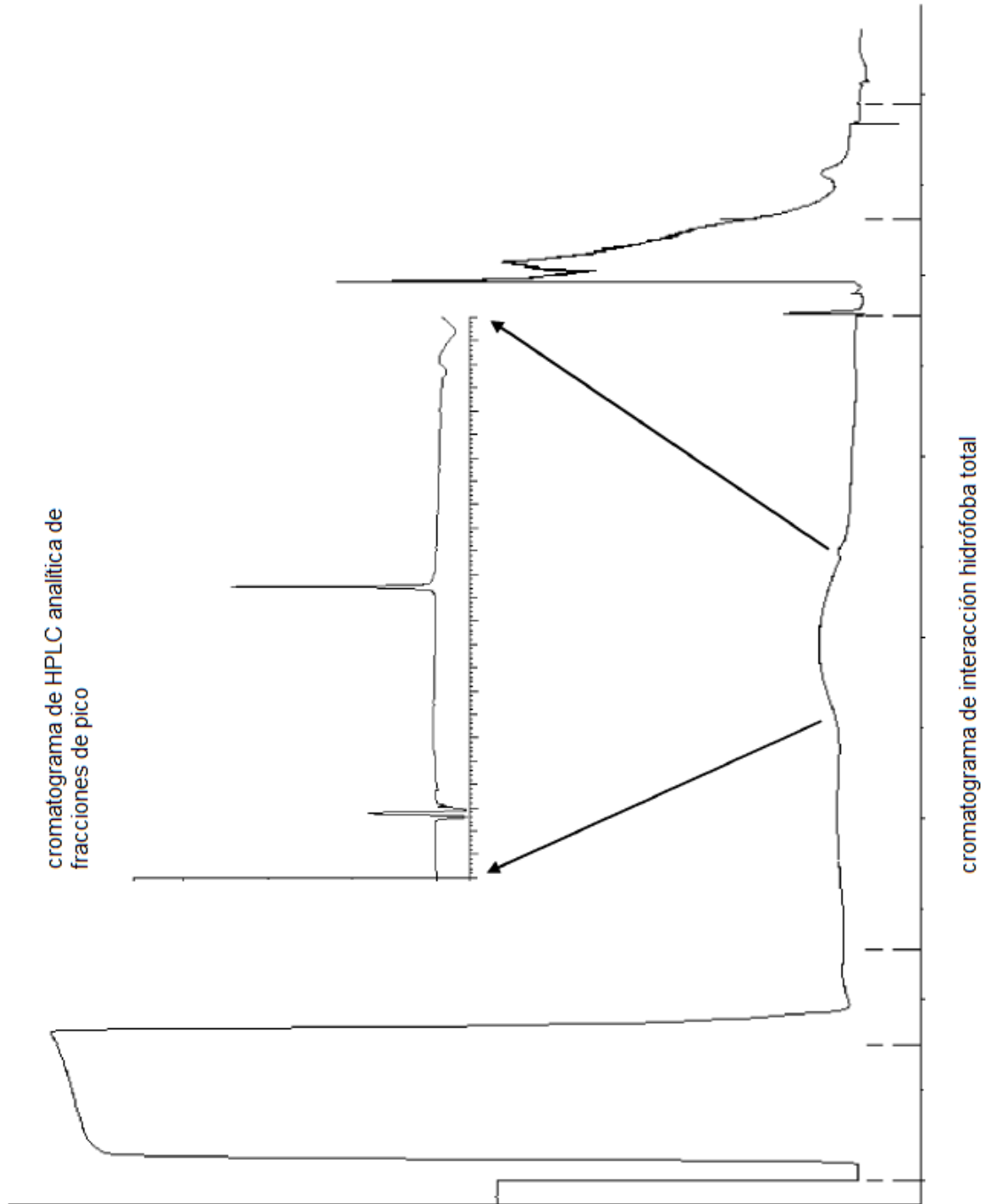


Fig. 10

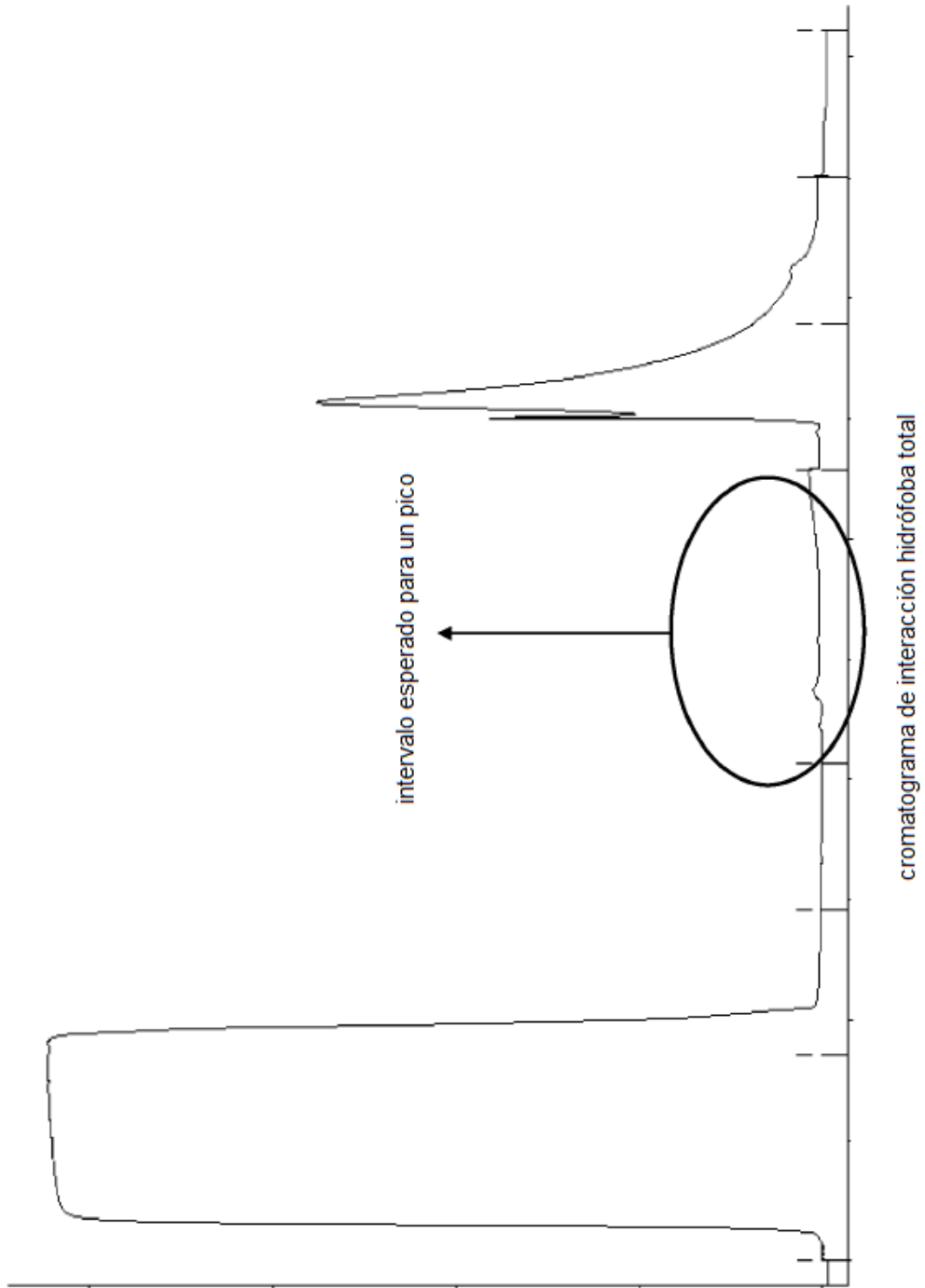


Fig. 11

