

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 781**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 10180725 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2292637**

54 Título: **Proceso para la extracción de proteínas**

30 Prioridad:

06.09.2002 US 408653 P

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

06.04.2016

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

GEHANT, RICHARD, L.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 565 781 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

Proceso para la extracción de proteínas

5 Antecedentes de la invención

[0001] Los procesos biotecnológicos para producir productos proteicos farmacéuticos o de diagnóstico utilizan en general etapas de extracción y purificación para obtener productos de interés a partir de un conjunto de fuentes. Las fuentes de las proteínas pueden incluir, por ejemplo, fluidos de cultivos de bacterias, levadura, células de mamífero y extractos de tejidos naturales.

[0002] En general, las etapas de extracción y purificación son numerosas y comprenden varias técnicas. El tipo de producto a producir, su uso previsto, y otros factores influyen en qué etapas son más apropiadas, qué grado de purificación es beneficioso, y cómo se puede llevar a cabo la purificación. En general, cuanto mayor es la pureza de producto deseada, más etapas se utilizarán en el proceso.

[0003] Los protocolos estándar de purificación de proteínas empiezan en general con la disociación de células y una etapa de clarificación para eliminar la debris celular y/o tisular de la proteína diana. Una manera habitual de clarificar una solución es mediante centrifugación. La eficacia de una etapa de centrifugación depende del tamaño de partícula, la diferencia de densidad entre partículas y líquido circundante, viscosidad de la alimentación, y similares. Para soluciones obtenidas a partir de células pequeñas, tales como *E. coli*, el tamaño de partícula pequeño y la viscosidad elevada reducen la capacidad de alimentación durante la centrifugación y pueden interferir con el proceso de clarificación. De este modo, se recomienda a menudo combinar una etapa de centrifugación con microfiltración. Aunque la microfiltración puede aliviar algunos de los problemas que se encuentran, la contaminación de las membranas de microfiltración también pueden ser un problema adicional.

[0004] Cada etapa adicional en un proceso de purificación de proteínas afecta tanto al coste de la purificación como al rendimiento global. Por consiguiente, los fabricantes buscan obtener la pureza de producto deseada de la forma más económica. Una manera de disminuir el coste de producción es reducir el número de etapas en un proceso de purificación. Alternativamente, las etapas en los procesos existentes se pueden modificar o aumentar para reducir la pérdida de proteína en cada etapa.

[0005] Los protocolos para la purificación de proteínas son bien conocidos y accesibles a través de internet (por ejemplo EMBL's Protein Expression and Purification Core Facility <http://www.pepcore.embl.de>). Un método para hacer más eficiente el proceso de purificación de proteínas es, por ejemplo, lisando células en un tampón que tiene un pH apropiado para el procesado posterior (por ejemplo, WO96/34622 o Nye et al, Mol. Immunol. 1995, 1131).

[0006] Chen et al. J. Mol. Biol. (1999), 293, 865-881 y Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263, 133-147 describen la purificación de anticuerpos anti-VEGF y de anticuerpos anti-factor tisular, respectivamente.

[0007] Un método que incrementa el rendimiento mediante la eliminación de etapas del proceso es la cromatografía de lecho expandido ("EBC"). La EBC es una técnica que utiliza un absorbente en un lecho fluidizado estable. Cuando se utiliza la EBC para purificar proteínas a partir de soluciones que contienen debris celular y/o debris tisular, la centrifugación previa no es necesaria. Aunque la utilización de EBC elimina una etapa del proceso, tanto la pérdida de producto como las desventajas del procesado pueden aparecer con EBC. El aparato de EBC mantiene un adsorbente en la columna con una frit, y se puede contaminar por la debris celular en la solución aplicada a la columna. La contaminación de la frit puede disminuir el rendimiento del producto, aumentar los tiempos de procesado y, en casos extremos, dejar el proceso inutilizable.

[0008] Por lo tanto, aun existe la necesidad de procesos y métodos que pueden realizar purificaciones de proteínas con una pureza más elevada a un coste menor.

Descripción resumida de la invención

55 [0009] La invención es tal como se describe en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

[0010]

60 La figura 1 es un gráfico que compara la contrapresión (psi) en función del tiempo para homogenatos acondicionados en la posthomogenización y la prehomogenización durante EBC.

La figura 2 es una fotografía que compara la contaminación de una frit sometida a homogenatos acondicionados en la posthomogenización y la prehomogenización

La figura 3 es una fotografía que compara pélets de soluciones centrifugadas acondicionados en la posthomogenización y la prehomogenización.

La figura 4 es un gráfico de la velocidad de flujo (cm/h) para EBC de un homogenato acondicionado en la posthomogenización, un homogenato acondicionado en la prehomogenización y una solución tampón a un pH que varía de 4,0 a 6,5.

La figura 5 es una fotografía de las interacciones entre una resina de EBC y el homogenato con MgSO₄ 30 mM y 45 mM.

La figura 6 es un gráfico de la concentración (mg/mL) de Fab'2 en soluciones con concentraciones variables de MgSO₄ y polietilenimina.

La figura 7 es un gráfico de barras de la capacidad (g Apo2L/L resina) de la resina para la proteína Apo2L a varias concentraciones de MgSO₄.

La figura 8 es un gel SDS-PAGE de homogenatos de Factor Anti-Tisular a pH de 4 a 7 que incluye un potenciador de la solubilidad o varias sales.

Descripción detallada de la invención

15 **[0011]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente”, el término “aproximadamente” se aplica a todos los valores numéricos, estén indicados o no explícitamente. El término “aproximadamente” se refiere en general a un intervalo de números que se considerarías equivalentes al valor citado (es decir, que tiene la misma función o resultado). En muchos casos, el término “aproximadamente” puede incluir números que están redondeados hasta la cifra significativa más próxima.

20 **[0012]** Los procesos de la presente invención están dirigidos en general a la extracción de proteínas diana heterólogas de células de *E. coli*. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “proteína diana heteróloga” se refiere a Fab VEGF y anticuerpo anti-factor tisular, producidos en *E. coli*. Se entiende en general que un proceso para extraer una proteína diana heteróloga dará lugar a un producto proteico que está enriquecido en la proteína diana heteróloga, pero también puede contener otros componentes. Entre los ejemplos de dichos otros componentes se incluyen, pero sin limitación, proteínas normalmente expresadas por la célula o el tejido huésped, 25
debris celular o caldo celular, por ejemplo.

[0013] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “biomasa” se refiere a por lo menos la debris celular. 30
Las “interacciones biomasa-biomasa” se refieren en general a las interacciones entre la debris celular que pueden conducir a la floculación. Las “interacciones biomasa-resina” se refieren en general a las interacciones entre la debris celular y la resina de la columna de EBC que pueden provocar que la debris celular se una a la columna y pueda finalmente contribuir a la contaminación de la columna.

35 **[0014]** Tal como se utiliza en el presente documento, la frase “disociar las células” se refiere a cualquier proceso que libera el contenido de la célula a la solución que contiene la célula. Entre los ejemplos de métodos de “disociación de las células” se incluyen, pero sin limitación, la homogenización, lizozima, sonicación, congelación-descongelación, Presión Francesa, y otros métodos de disociación celular químicos mecánicos o físicos. La etapa del proceso de “disociación de las células” se puede llevar a cabo con una o más etapas, por ejemplo, múltiples etapas que utilizan 40
una homogenización de 4 pasos.

[0015] Tal como se utiliza en el presente documento, la etapa de “separación de la debris celular de la proteína liberada” se puede llevar a cabo mediante un conjunto de técnicas conocidas. Entre los ejemplos de dichas técnicas se incluyen, pero sin limitación, centrifugación, microfiltración, cromatografía de lecho empaquetado (“PBC”), 45
cromatografía de lecho expandido (“EBC”), u otros tipos de cromatografía en columna, por ejemplo. La etapa de “separación de la debris celular de la proteína liberada” no requiere una separación completa de toda la debris celular.

[0016] La centrifugación se puede utilizar para separar la debris celular de la proteína liberada. Se puede utilizar 50
cualquier proceso de centrifugación. Los parámetros específicos de la centrifugación dependerían, por lo menos en parte, de factores, tales como la naturaleza de la proteína diana heteróloga (secuencia de aminoácidos y carga, por ejemplo) y la naturaleza de la célula huésped o tejido huésped que expresan la proteína diana heteróloga. Un ejemplo de un proceso de centrifugación que se puede utilizar es una centrífuga de apilamiento de discos continuos.

55 **[0017]** La EBC se puede utilizar para separar la debris celular de la proteína liberada. La EBC es una operación de paso único en la que las proteínas deseadas se purifican de la solución cruda que contiene partículas sin la necesidad de clarificación, purificación inicial o concentración. Aunque no es necesario, la EBC se puede utilizar con etapas anteriores de clarificación, purificación o concentración, tales como centrifugación, microfiltración o similar.

60 **[0018]** La EBC utiliza un lecho adsorbente que se suspende en un equilibrio causado por el equilibrio entre la velocidad de sedimentación de partículas y la velocidad de flujo de líquido ascendente. El adsorbente se expande en el lecho y crea una distancia entre las partículas de adsorbente (esta distancia corresponde al volumen vacío tal como se utiliza este término en técnicas de cromatografía), que permite un paso relativamente fácil de las células, debris celular, y otras partículas que pueden estar presentes en la solución.

65

[0019] Los métodos y protocolos específicos para utilizar la EBC para separar la proteína liberada de la debris celular son generalmente conocidos. Véase, por ejemplo, "Expanded Bed Adsorption, Principles and Methods", Edition AB (18-1124-26), publicada por Amersham Pharmacia Biotech. Los parámetros específicos de un protocolo útil dependerían, por lo menos en parte, de la naturaleza de la proteína diana heteróloga a separar, las células huésped o tejido huésped de los que se separa, y otros de dichos factores.

[0020] Un proceso de la invención incluye una etapa de disminución del pH de una solución que contiene las células de *E. coli* completas que expresan una proteína diana heteróloga para formar una solución ácida. Tal como se utiliza en el presente documento, "células de *E. coli* completas" se refiere a células de *E. coli* que no han sido disociadas. Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido" significa que tiene un pH que es inferior a 7,0. El término "no ácido" significa que tiene un pH que es 7,0 o superior.

[0021] En el proceso de la invención, el pH de la solución de células completas disminuye hasta un pH que es aproximadamente 4,0 – 5,0, más preferiblemente hasta aproximadamente 4,0 – 4,5. Alternativamente, el pH disminuye hasta no más de 4,0 e incluso puede disminuir hasta aproximadamente 2,0, dependiendo de la naturaleza de la proteína diana heteróloga, por ejemplo.

[0022] La disminución del pH de la solución se lleva a cabo en general mediante la adición de un ácido. Se puede utilizar cualquier ácido. Los preferidos son los ácidos que presentan una capacidad de tamponamiento al pH disminuido, por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, y similares. En general, el ácido se añadirá a una concentración de aproximadamente 50 a 100 mM, pero también se pueden utilizar concentraciones superiores o inferiores.

[0023] Se ha descubierto sorprendentemente que la disminución del pH de la solución de células completas para formar una solución ácida antes de que se disocien las células proporciona un proceso específico y ventajas del producto. Por ejemplo, la viscosidad, floculación, velocidad de flujo, sistemas de procesamiento, y tiempos de procesado se pueden mejorar cuando se disminuye el pH antes de disociar las células. El rendimiento y la calidad de la proteína diana heteróloga también se pueden mejorar cuando se disminuye el pH antes de disociar las células.

[0024] En general, las ventajas de la disminución del pH aumentan a medida que el pH disminuye desde 7. La disminución del pH antes de la disociación celular también puede servir para incrementar la pureza del producto proteico que contiene la proteína heteróloga. Se cree, aunque no con certeza, que la disminución del pH de la solución de células completas sirve para aumentar la pureza del producto proteico mediante la eliminación de la debris celular y los contaminantes de células completas de la solución después de disociar las células. A medida que el pH disminuye hasta un pH ácido, en general aumenta la pureza del producto proteico diana heterólogo. Además, a medida que el pH disminuye de pH 5 a 4, la pureza de la proteína diana muestra un aumento más sustancial en relación con la disminución de pH 6 a 5, por ejemplo.

[0025] El proceso de la invención incluye la adición de por lo menos un potenciador de la solubilidad a la solución de células completas o la solución ácida de células completas, o la solución de células disociadas. Preferentemente, el por lo menos un potenciador de la solubilidad se añade a la solución de células completas antes o simultáneamente con la disminución del pH, más preferiblemente antes.

[0026] En general, el potenciador de la solubilidad se añade en una cantidad que es eficaz para aumentar la solubilidad de la proteína diana heteróloga, y puede depender, por lo menos en parte, de la naturaleza de la proteína diana heteróloga y el homogenato o la solución de células completas. En general, mayores cantidades de potenciador de solubilidad incrementará la solubilidad de la proteína diana heteróloga.

[0027] Los potenciadores de solubilidad son preferiblemente moléculas que incluyen un catión divalente, tal como magnesio (Mg^{+2}), calcio (Ca^{+2}), y similares. Los potenciadores de solubilidad preferidos para utilizar en un proceso de la invención incluyen, pero sin limitación, sulfato de magnesio ($MgSO_4$), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), sulfato de calcio ($CaSO_4$), y cloruro de calcio ($CaCl_2$).

[0028] Los potenciadores de solubilidad se añaden en general en forma acuosa, en una cantidad que da lugar a una concentración final de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, preferiblemente de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 120 mM

[0029] La polietilenimina ("PEI") también puede funcionar como potenciador de solubilidad en un proceso de la invención. En general, la PEI se añade a la solución en una forma acuosa y en una cantidad que da lugar a una concentración final de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5% v/v de una solución al 50% p/v, preferiblemente aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,3%.

[0030] Se puede utilizar por lo menos un potenciador de solubilidad solo o en combinación y se puede añadir al proceso en cualquier etapa, pero se añade preferiblemente antes de la disociación celular.

[0031] También se describen métodos de disminución de las interacciones biomasa-biomasa, interacciones

biomasa-resina o una combinación de las mismas en una solución de células de *E. coli* disociadas que incluye la disminución del pH de la solución que contiene las células de *E. coli* completas que expresan una proteína diana heteróloga para formar una solución ácida y la disociación de las células para liberar la proteína, donde se reducen las interacciones biomasa-biomasa, interacciones biomasa-resina o una combinación de las mismas de la solución de células disociadas en comparación con una solución no ácida de células que disminuye el pH después de la disociación celular.

[0032] El nivel de las interacciones biomasa-biomasa, interacciones biomasa-resina o una combinación de las mismas de una solución también se puede controlar en base a sus efectos en el proceso que la solución experimenta, tal como EBC, PBC, centrifugación, o microfiltración, por ejemplo. Estos efectos incluyen, pero sin limitación, la agregación de la debris celular (también referido como la formación de homogenato o biomasa o floculación), velocidad de flujo a través de la columna, contaminación de una frita, contaminación de la centrífuga de apilamiento de discos continuos, contrapresión en una columna EBC o contaminación de la rejilla de entrada a la columna, y similares.

[0033] También se describe un método para disminuir la viscosidad de una solución de células *E. coli* disociadas que incluye disminuir el pH de una solución que contiene las células de *E. coli* completas que expresan una proteína diana heteróloga para formar una solución ácida, y disociar las células para liberar la proteína en la solución ácida, donde la viscosidad de la solución de células disociadas se reduce en comparación con una solución no ácida de células en la que se reduce el pH después de la disociación celular.

[0034] La viscosidad se puede medir mediante cualquier método conocido para los expertos en la materia habiendo leído esta memoria. Entre los ejemplos de dispositivos para medir la viscosidad se incluyen, pero sin limitación, los viscosímetros Engler, Saybolt, y Redwood. Todos los viscosímetros de ejemplo indican la viscosidad mediante la velocidad de flujo del líquido de prueba a través de un orificio de diámetro estándar o la velocidad de flujo de una bola de metal a través de una columna del líquido. Otros viscosímetros utilizan la velocidad de un huso de rotación o una paleta inmersa en el líquido de prueba. Otros tipos de viscosímetros de ejemplo incluyen dispositivos Brookfield y Krebs-Stormer.

[0035] También se describen métodos de disociación de la capacidad floculante en una solución de células de *E. coli* disociadas que incluyen la disminución del pH de una solución que contiene células de *E. coli* completas que expresan la proteína diana heteróloga para formar una solución ácida y la disociación de las células para liberar la proteína, donde el contenido de humedad de un agente floculante en la solución de proteínas liberadas es mayor cuando las células se disocian en una solución ácida en comparación con una solución en ácida de células en la que se reduce el pH después de la disociación celular.

[0036] Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "alteración de la capacidad floculante" incluye cambios que aumentan el contenido de humedad, disminuyen la tendencia a la agregación de floculante, y similares.

[0037] Otro método de controlar la capacidad floculante en un homogenato es controlar la contaminación de la centrífuga de apilamiento de discos continuos. Esto se puede medir mediante la turbidez. La turbidez se puede medir en NTU (Unidades Nefalométricas de Turbidez).

Ejemplos

[0038] Los ejemplos 1-8 se muestran a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1

50 El acondicionamiento de células *E. coli* antes de la disociación altera la floculación de proteínas

[0039] Las células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba un fragmento de anticuerpo anti-VEGF (Rhufab V2, Chen et. al., 1999 J. Mol. Biol. 293: 865-881) se acondicionaron previamente antes de la homogenización mediante la disminución del pH de la solución celular hasta pH 4,0 a través de la adición de ácido cítrico 60 mM. También se añadió un potenciador de la solubilidad, MgSO₄, a la solución celular, hasta una concentración de aproximadamente 120 mM. Las células se disociaron mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluidics Corp., Newton, MA) a 8000 psig, 2-8°C. Después de la homogenización, se añadieron 5 volúmenes de agua al homogenato y el homogenato se pasó a través de una rejilla de entrada a la EBC (Multilayered SS316L, 100 µm, 1,8 mm de grosor, 2,5 cm diámetro) (G.Bopp & Co., Zurich, Suiza), con una velocidad de flujo de 25 ml/minuto (300 cm/h).

[0040] Las células de control se disociaron de forma similar mediante una homogenización de 4 pasos, pero con un acondicionamiento posterior a la homogenización a pH 4,0 y sin MgSO₄ añadido. Se añadió ácido a las células homogenizadas hasta pH 4,0, así como MgSO₄ (120 mM) y 2 volúmenes de agua. El material resultante se centrifugó hasta obtener en pélets el material insoluble. El sobrenadante de control se aplicó a la rejilla de entrada a

la EBC, descrita anteriormente. Los resultados, mostrados en las figuras 1 y 2 y en la tabla siguiente, demuestran que el acondicionamiento previo de células *E. coli* a pH 4,0 y en presencia de MgSO₄ reducía la interacción biomasa-biomasa. Esta reducción se demuestra por la menor floculación de la solución proteica, tal como se observa en la diferencia en la contrapresión, 0 psig para el homogenato antes del acondicionamiento frente a 11 psig para el homogenato posterior al acondicionamiento (véase la tabla 1, así como la figura 1). La figura 1 muestra la presión en función del tiempo para el acondicionamiento previo a la homogenización y el acondicionamiento posterior a la homogenización.

Tabla 1

Incremento de la contrapresión en la rejilla de salida de EBC		
	(L de homogenato)/cm ²	psig
Pre-acondicionamiento	> 4,3	0
Post-acondicionamiento	1,7	11

10 [0041] La figura 2 muestra que el material floculado hallado en el control posterior al acondicionamiento está ausente de la rejilla de la muestra acondicionada previamente. Estos resultados ponen de manifiesto una reducción de las interacciones biomasa-biomasa cuando el pH se reduce antes de la disociación de las células para liberar la proteína.

15 Ejemplo 2

El acondicionamiento de células *E. coli* antes de la disociación disminuye la contaminación de la centrifuga de apilamiento de discos continuos

20 [0042] Se utilizó un vector plasmídico basado en pBR322 para expresar un transgén que expresaba Fab VEGF (Chen et al., 1999, J. Mol. Bio., 293: 865-881) en células *E. coli* (cepa: 60E4, genotipo: W3110 DphuA DphoA DhtrA DompT Dptr ilvG2096 DrhaR DfucP). El vector presentaba una delección rop para producir un número de copias más elevado, y se utilizó el promotor phoA para la transcripción. Cada gen contenía una secuencia señal de enterotoxina II estable al calor antes del gen del anticuerpo para exportar al periplasma. Tanto la resistencia a tetraciclina como a
25 ampicilina estaban intactas en el plásmido. Las fermentaciones se realizaron en una escala de 10 L con un nivel fijo de fosfato en el medio, de manera que las células se agotaban en fosfato a medida que crecían, conduciendo a la inducción del promotor phoA. Las células de *E. coli* se acondicionaron antes de la homogeneizaron mediante la disminución del pH de la solución de las células hasta pH 4,0 a través de la adición de ácido cítrico 60 mM. También se añadió un potenciador de solubilidad, MgSO₄, a la solución de células, hasta una concentración de
30 aproximadamente 60 mM. Las células se disociaron mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8°C. Después de la homogenización, se añadieron 2 volúmenes de agua al homogenato y el homogenato se centrifugó en una centrifuga de apilamiento de discos continuos (Modelo PX205, Alfa Laval, Inc., Richmond, VA), con una velocidad de flujo de 1,0 L/minuto. La tasa de inyección se fijó para una inyección cada vez que se alcanzaba un 60% del volumen del recipiente.

35 [0043] Las células de control se disociaron de forma similar mediante una homogenización de 4 pasos, pero con un acondicionamiento posterior a la homogenización. Se añadió ácido cítrico 60 mM a las células homogeneizadas, hasta pH 4,0, así como MgSO₄ (60 mM) y 2 volúmenes de agua. El material resultante se centrifugó hasta obtener en pélets el material insoluble.

40 [0044] La contaminación de la centrifuga de discos continuos se midió como el incremento en la turbidez (NTU) del homogenato de la proteína centrifugada. Los datos se resumen en la Tabla 2 y muestran una contaminación reducida (turbidez de solución) de la centrifuga cuando las células se preacondicionan mediante la disminución del pH y la adición de un potenciador de la solubilidad antes de la disociación.

45

Tabla 2

Turbidez		
	Vol. homogenato	NTU
Prehomogenización	> 1000 L	<50
Posthomogenización	< 100 L	>100

[0045] La figura 3 muestra el pélet de una centrifugación en la centrifuga de apilamiento de discos continuos para el acondicionamiento previo a la homogenización y el acondicionamiento posterior a la homogenización. Tal como se
50 puede observar en la figura 3, la consistencia de la capacidad floculante es muy diferente. El pélet de la etapa de acondicionamiento previa a la homogenización parece tener más contenido de humedad y produce un "sólido" más suave que el pélet de la etapa de acondicionamiento posterior a la homogenización. Estos resultados ponen de manifiesto una reducción de las interacciones biomasa-biomasa cuando las células se acondicionan previamente a la disociación.

55

Ejemplo 3

El acondicionamiento de células *E. coli* antes de la disociación incrementa la velocidad de flujo en la columna de EBC

[0046] Para analizar los efectos del acondicionamiento previo en la velocidad de flujo, se añadieron homogenato de Fab VEGF obtenido de células acondicionadas previamente, preparado tal como se describe anteriormente en el ejemplo 1 y el homogenato de control acondicionado posteriormente a columnas EBC SPXL Streamline (Amersham Bioscience, Inc. Piscataway, NJ) (diámetro 2,6 cm X 100 cm de altura) con una altura del lecho lleno de resina de 30 cm y una altura del lecho expandido de 90 cm. Las columnas de EBC se equiparon cada una con una rejilla de entrada de la EBC (Multilayered SS316L, 100 µm, 1,8 mm de grosor, 2,5 cm de diámetro). La velocidad de flujo de los homogenatos a través de las columnas se comparó entre sí utilizando tampón como control. Las muestras de acondicionamiento previo y posterior a la homogenización se prepararon a pH acondicionante 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, y 6,5.

[0047] Los resultados se representan en la figura 4 y demuestran que el acondicionamiento previo a la homogenización daba lugar a una velocidad de flujo incrementada a través de la columna de EBC. La velocidad de flujo también se incrementaba a medida que disminuía el pH. Estos resultados ponen de manifiesto una reducción de las interacciones biomasa-biomasa, así como una reducción de las interacciones biomasa-resina de EBC e indican mejores velocidades de flujo obtenidas con un acondicionamiento previo.

20 **Ejemplo 4**

Efecto de la concentración del potenciador de la solubilidad en interacciones biomasa-resina

[0048] Las células de *E. coli* (cepa: 43E7, genotipo: W3110 DfhuA phoADE15 D(argF-lac)169 ptr3 degP41 DompT (DnmpCfepE) ilvG2096) que contenían un transgén que expresaba Apo2L (Pitlie et al., 1996, J. Bio. Chem., 271: 12687-12690) se utilizaron para expresar la proteína. Se utilizó para la expresión un vector plasmídico basado en pBR22 con un promotor phoA que dirigía la transcripción. El plásmido contenía 3 genes de ARNt para una mayor producción y presentaba las resistencias de tetraciclina y ampicilina intactas. Las células se disociaron mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8°C.

[0049] El homogenato se acondicionó mediante la adición de un potenciador de la solubilidad, MgSO₄, hasta una concentración de aproximadamente 45 mM o 30 mM. Se añadieron dos (2) volúmenes de agua y se ajustó el pH del homogenato hasta pH 6,5 a través de la adición de ácido cítrico 60 mM. El homogenato acondicionado se desarrolló a través de una columna de EBC (diámetro 2,5 cm X 210 cm altura) que contenía SP Streamline (Amersham Bioscience, Inc.) con una altura de lecho lleno de resina de 65 cm, y una altura de lecho expandido de 195 cm. La columna de EBC se equipó con una rejilla de entrada a EBC (Multilayered SS316L, 100 µm, 1,8 mm de grosor, 2,5 cm de diámetro) (Amersham Bioscience, Inc). La velocidad de flujo en la columna fue de 200 cm/hora.

[0050] La figura 5 muestra imágenes fotográficas de la resina tomadas desde la rejilla superior después de la fase de almacenamiento que demuestran una diferencia en las interacciones resina-biomasa en las dos soluciones de homogenato en la columna de EBC acondicionada con cantidades diferentes de MgSO₄. El homogenato acondicionado con la concentración más elevada de MgSO₄ (45mM) mostró menos interacciones resina-biomasa que el acondicionado con MgSO₄ 30 mM que mostró una mayor agregación de la resina.

45 **Ejemplo 5**

Efecto de la concentración del potenciador de la solubilidad en la solubilidad de la proteína

[0051] Se disociaron células de *E. coli* (cepa: 60H4, genotipo: W3110 DfhuA phoADE15 D(argF-lac)169 degP41 deoC Dprc spr DmanA) que contenían un transgén que expresaba un anticuerpo anti-Factor Tisular (Presta et al., 2001, Thromb. Haemost., 85: 379-89) mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8°C. El homogenato se acondicionó mediante la adición de dos potenciadores de solubilidad, PEI a varias concentraciones y MgSO₄, hasta una concentración de 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, ó 50 mM. El pH de la solución se ajustó hasta pH 4,0 a través de la adición de ácido cítrico y se añadieron 2 volúmenes de agua a la solución ajustada. El homogenato se centrifugó para eliminar los sólidos y se añadió el sobrenadante a una columna de afinidad G porosa (Perceptives Biosystems). La proteína se eluyó de la columna con un tampón de pH bajo y se cuantificó.

[0052] La figura 6 muestra la concentración de proteína anticuerpo anti-Factor Tisular en el sobrenadante para cada una de las muestras de prueba. Estos resultados muestran en general que a medida que se incrementaba la cantidad del potenciador de solubilidad, MgSO₄ o PEI, se obtenía más proteína.

65 **Ejemplo 6**

Efecto de la concentración del potenciador de la solubilidad en la capacidad de la resina de EBC

[0053] Se disociaron células de *E. coli* que contenía un transgén que expresaba Apo2L /TRAIL (Ashkenazi et al., 1999, J. Clin. Invest., 104: 155-162) mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. Después de la homogenización, el homogenato se acondicionó a través de la adición de un potenciador de la solubilidad, MgSO₄, hasta una concentración de 10 mM, 20 mM, ó 40 mM. Un homogenato de control no contenía MgSO₄. A continuación, se ajustó el pH del homogenato hasta pH 6,5 a través de la adición de ácido cítrico 60 mM, y se añadieron 2 volúmenes de agua a la solución ajustada. El homogenato acondicionado se mezcló a continuación con 1 mL de resina de EBC, SP Streamline (Amersham Bioscience, Inc.), en un tubo de plástico cónico de 15 ml con tapón de rosca en exceso de homogenato acondicionado.

[0054] Se determinó la capacidad de la resina para cada una de las soluciones de homogenato acondicionadas y los datos se muestran en la figura 7. La presencia del potenciador de la solubilidad, MgSO₄, aumentó la capacidad de la resina para Apo2L a 10 mM y 20 mM. Sin embargo, a medida que la concentración del MgSO₄ continuaba creciendo (40 mM), disminuía la capacidad de la resina. Este descenso puede ser debido a la mayor conductividad de la solución con mayores concentraciones de MgSO₄

Ejemplo 7**Efecto del ajuste de pH en la pureza de la proteína**

[0055] Las células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba un anticuerpo anti-Factor Tisular se disociaron mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. El homogenato se acondicionó a través de la adición de PEI al 0,2%. También se añadieron varias sales, incluyendo el potenciador de la solubilidad, MgSO₄ a 100 mM, NaCl a 250 mM, y Na₂SO₄ a 100 mM. El pH de la solución se ajustó hasta pH 4,0, 5,0, 6,0, ó 7,0 mediante la adición de ácido cítrico y se añadieron 2 volúmenes de agua. El homogenato se centrifugó y el sobrenadante se sometió a análisis SDS-PAGE a Bis-Tris/MOPS al 10% (Novex, Inc.) con tinción de Azul de Coomassie.

[0056] La figura 8 es un gel electroforético que muestra los productos proteicos resultantes. El gel demuestra que a medida que disminuía el pH del homogenato celular de 7,0 a 4,0, disminuía la cantidad de proteína contaminante (es decir, una proteína diferente de la proteína heteróloga, anticuerpo anti-Factor Tisular) presente en el homogenato. Apareció un enriquecimiento espectacular del producto proteico heterólogo deseado en el homogenato de células de *E. coli* cuando el pH disminuyó de 5,0 a 4,0.

Ejemplo 8**Efecto del ajuste de pH en la pureza de la proteína**

[0057] Las células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba un anticuerpo anti-Factor Tisular se disociaron mediante una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. El homogenato se acondicionó a través de la adición de dos potenciadores de la solubilidad, PEI al 0,2% y MgSO₄, a 100 mM. El pH de la solución se ajustó hasta pH 4,0, 5,0, 6,0, ó 7,0 mediante la adición de ácido cítrico y se añadieron 2 volúmenes de agua. El homogenato se centrifugó y el sobrenadante se sometió a HPLC utilizando una columna de Proteína G (Perceptive Biosystems, Inc.) con un reactivo de tinción Bradford (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Los datos se muestran a continuación en la tabla 3 y demuestra un mayor de incremento de veces en la pureza de proteína cuando la proteína se produjo a partir de un homogenato acondicionado a pH ácido.

Tabla 3

pH	Brad (g/L)	ProG (g/L)	ProG/Brad	Incremento de la Pureza (pH/pH 7)
4,0	8,5	2,12	0,250	5,0 veces
5,0	25,3	2,28	0,090	1,7 veces
6,0	36,9	2,35	0,064	1,2 veces
7,0	45,0	2,33	0,052	----

Ejemplo de referencia 9**Comparación de EBC utilizando un potenciador de la solubilidad y PBC sin potenciador de solubilidad**

[0058] La purificación de la cromatografía de lecho empacado se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sometieron células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba Apo2L/Trail a una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. Después de la homogenización, se añadieron dos volúmenes de agua y también se añadió polietilimina para dar lugar a una

concentración final de 0,3% en peso. A continuación, la solución de homogenato se centrifugó en una centrífuga de apilamiento de discos continuos (Modelo PX205, Alfa Laval, Inc.), con una velocidad de flujo de 1,0 L/minuto. El sobrenadante se purificó en una columna SP Sefarosa FF (2,5 X 20 cm) (Amersham Biosciences).

- 5 [0059] La purificación de EBC se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sometieron células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba Apo2L/Trail a una homogenización de 4 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. Después de la homogenización, se añadió sulfato de magnesio (MgSO₄) hasta una concentración final de 30 mM, se añadieron dos volúmenes de agua y se ajustó el pH de la solución hasta pH 6,5. A continuación, se sometió el homogenato a EBC con un adsorbente SP Streamline
- 10 (Amersham Bioscience, Inc.) en una columna (2,5 X 65) cm y una columna (2,5 X 14 cm).

[0060] La tabla 4 siguiente compara la recuperación de Apo2L/Trail de los tres procesos.

Tabla 4

Porcentaje de recuperación				
Técnica	Extracción	Centrifugación	Cromatografía	Global
Empaquetado (SPFF) 2,5 cm diámetro	84%	88%	95%	70%
Expandido (SP Str.) 2,5 cm diámetro			95%	95%
Expandido (SP Str.) 14 cm diámetro			94%	94%

- 15 [0061] Los protocolos utilizados anteriormente dieron lugar a la misma velocidad de flujo (200 cm/hora) y al mismo volumen de carga (2 volúmenes de agua) que el protocolo PBC; por lo tanto, no hubo pérdida en el tiempo de procesado global de carga, que fue de 4,5 horas. La adición de MgSO₄ como potenciador de la solubilidad sirvió para aumentar la solubilidad de Apo2L/Trail a medida que disminuía el pH de 7,5 a 6,5, incrementando de este modo la capacidad de la resina de EBC. El MgSO₄ redujo las interacciones homogenato-resina, de manera que se
- 20 minimizaba la formación de agregados de baja densidad durante la fase carga de EBC, incrementando así la recuperación de proteína.

Ejemplo de referencia 10

- 25 **Comparación de la cromatografía de lecho empaquetado y la cromatografía de lecho expandido con el acondicionamiento de homogenato**

[0062] La purificación de la cromatografía de lecho empaquetado (PBC) se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sometieron células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba Apo2L/Trail a una homogenización de 4

30 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. Después de la homogenización, se añadieron dos volúmenes de agua y se añadió polietilenimina hasta una concentración final de 0,3% en peso. A continuación, la solución se centrifugó en una centrífuga de apilamiento de discos continuos (Modelo PX205, Alfa Laval, Inc.), con una velocidad de flujo de 1,0 L/minuto. El sobrenadante se purificó en una

35 columna SP Sefarosa FF (2,5 X 20 cm) (Amersham Biosciences).

[0063] La purificación de la cromatografía de lecho expandido (EBC) se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sometieron células de *E. coli* que contenían un transgén que expresaba Apo2L/Trail a una homogenización de 4

40 pasos con un homogenizador Modelo HC-8000/3A (Microfluids, Inc.) a 8000 psig, 2-8° C. Se añadió MgSO₄ al homogenato para obtener una concentración final de MgSO₄ 30 mM. El pH de la solución también se ajustó hasta pH 6,5 y se añadieron cinco volúmenes de agua. A continuación, se sometió el homogenato a EBC con un adsorbente SP Streamline (Amersham Bioscience, Inc.) en una columna (2,5 X 30) cm y una columna (2,5 X 14 cm).

[0064] La tabla 5 siguiente compara la recuperación de FAB V2 (AMD) de los tres procesos.

Tabla 5

Porcentaje de recuperación				
Técnica	Extracción	Centrifugación	Cromatografía	Global
Empaquetado (SPFF) 2,5 cm diámetro	90%	86%	97%	75%
Expandido (SP Str.) 2,5 cm diámetro			96%	96%
Expandido (SP Str.) 14 cm diámetro			97%	97%

45

[0065] Aunque el protocolo de EBC utilizado anteriormente dio lugar a un tiempo total de carga que era 4 veces más largo que el del protocolo de PBC (24 horas frente a 6 horas), la recuperación de proteína aumentó

ampliamente utilizando EBC. El MgSO_4 sirvió para reducir las interacciones homogenato-homogenato y homogenato-resina y de este modo aumentó los parámetros de procesado del protocolo de EBC. El ajuste del pH antes de la homogenización (preacondicionamiento) también ayudó al procesado mediante la reducción de las interacciones homogenato-homogenato, incrementando adicionalmente los rendimientos de proteína (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

- 1.- Proceso para extraer un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de células de *E. coli*, que comprende:
- 5 a) disminuir el pH de una solución que contiene células de *E. coli* que expresan un anticuerpo o fragmento de anticuerpo hasta un pH que no es superior a 4 o de 4,0 a 5,0;
- b) añadir por lo menos un potenciador de la solubilidad a la solución, en el que el potenciador de la solubilidad comprende un catión divalente o polietilenimina;
- c) disociar las células para liberar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en la solución; y
- 10 d) separar la debris celular del anticuerpo o fragmento de anticuerpo liberado para obtener un producto de anticuerpo o fragmento de anticuerpo enriquecido en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que el pH de la solución que contiene células de *E. coli* se disminuye antes de disociar las células; en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un Fab anti-VEGF o un anticuerpo anti-factor tisular.
- 15 2. Proceso, según la reivindicación 1, en el que el pH de la solución se disminuye hasta un pH de 4,0 a 5,0, o en el que el pH de la solución se disminuye hasta un pH de 4,0.
3. Proceso, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el pH de la solución se disminuye mediante la adición de un ácido que tiene capacidad de tamponamiento al pH disminuido.
- 20 4. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el ácido es ácido cítrico.
5. Proceso, según la reivindicación 3 ó 4, en el que el ácido se añade a una concentración de aproximadamente 50 a 100 mM.
- 25 6. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha separación comprende centrifugación.
7. Proceso, según la reivindicación 6, que comprende además purificar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo a partir del producto de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 30 8. Proceso, según la reivindicación 7, en el que dicha purificación comprende una cromatografía en columna.
9. Proceso, según la reivindicación 8, en el que dicha cromatografía en columna es una cromatografía de lecho expandido.
- 35 10. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho al menos un potenciador de la solubilidad se añade a la solución antes o simultáneamente con dicha disminución del pH.
11. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el potenciador de la solubilidad se añade en forma acuosa, en una cantidad que da lugar a una concentración final de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 120 mM.
- 40 12. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho al menos un potenciador de la solubilidad comprende un catión divalente.
- 45 13. Proceso, según la reivindicación 12, en el que el catión divalente es magnesio o calcio.
14. Proceso, según la reivindicación 12, en el que dicho al menos un potenciador de la solubilidad comprende sulfato de magnesio o cloruro de magnesio.
- 50 15. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12-14, en el que el catión divalente se añade en una cantidad que da lugar a una concentración final de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM.
16. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho al menos un potenciador de la solubilidad comprende polietilenimina.
- 55 17. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 16, en el que la polietilenimina se añade en una cantidad que da lugar a una concentración final de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,3% v/v de una solución al 50% p/v.
- 60 18. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que dicho al menos un potenciador de la solubilidad comprende un catión divalente y polietilenimina.

Fig. 1

Homogenato acondicionado Fab VEGF (pH 4,0/ MgSO₄ 120 mM /5 vol. agua)

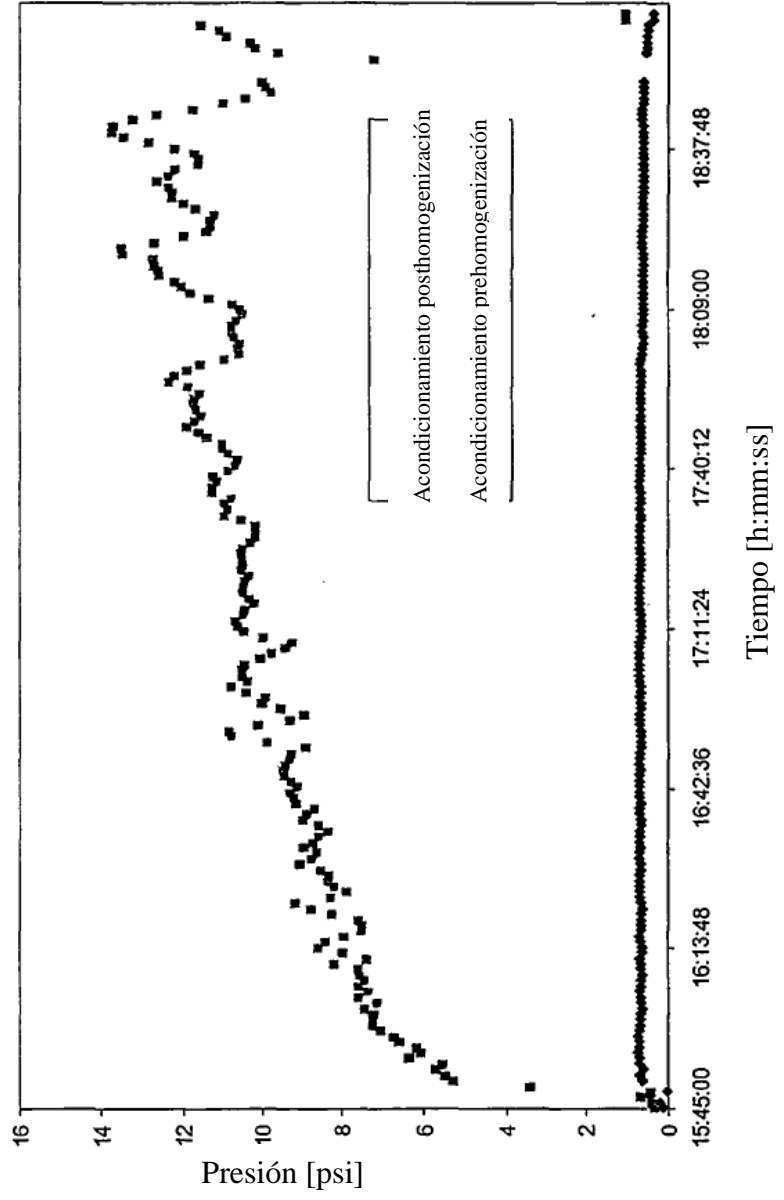


Fig. 2

Acondicionamiento
posthomogenización

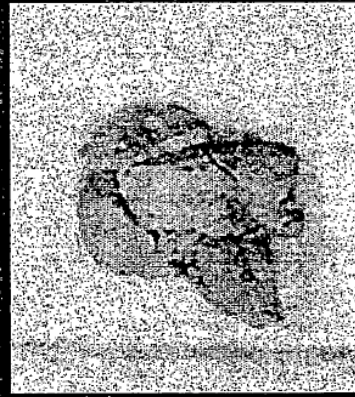
Acondicionamiento
prehomogenización



Fig 3

Consistencia del pélet después de centrifuga:
Homogenato a VF (MgSO₄ 60 mM y ajuste pH 4,0)

Acondicionamiento
posthomogenización



Acondicionamiento
prehomogenización



Fig. 4

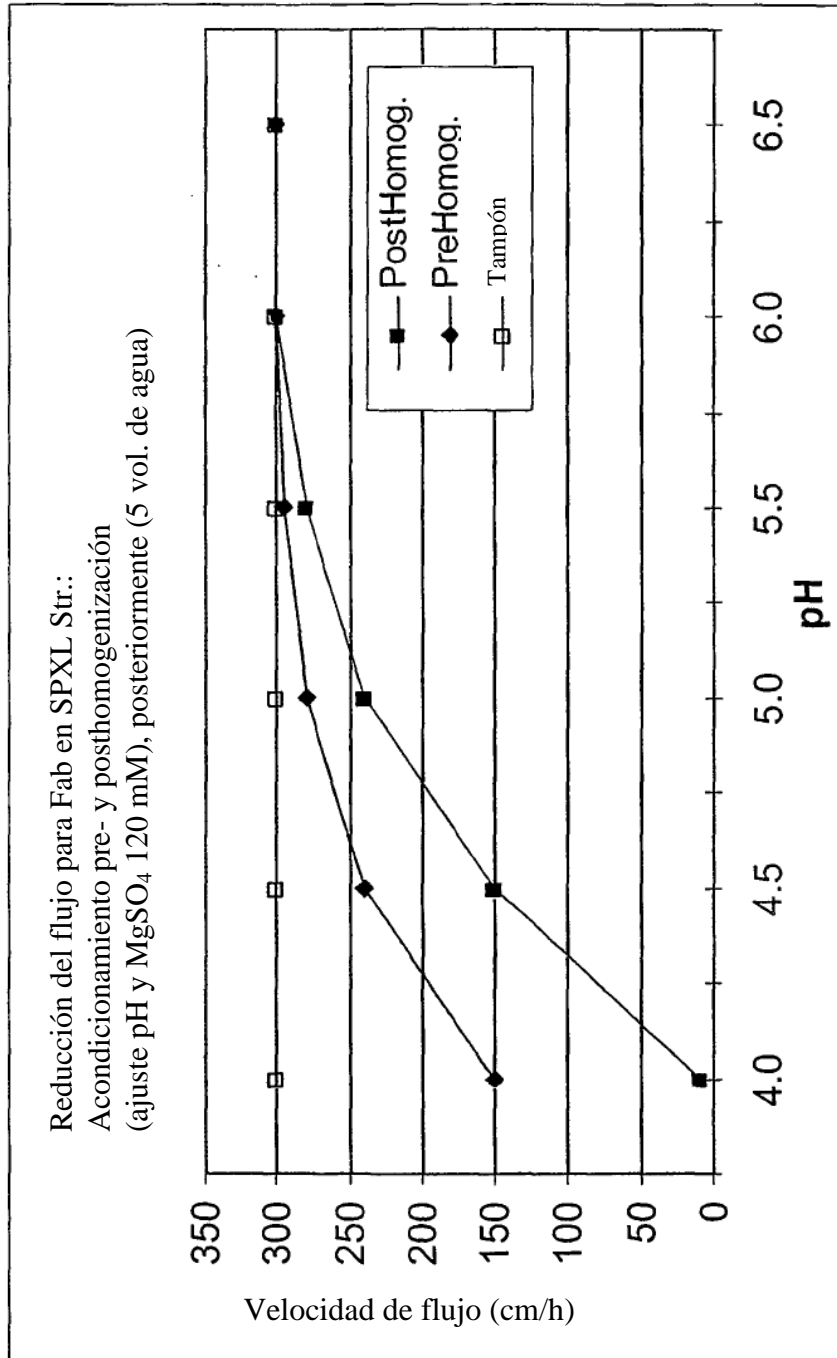
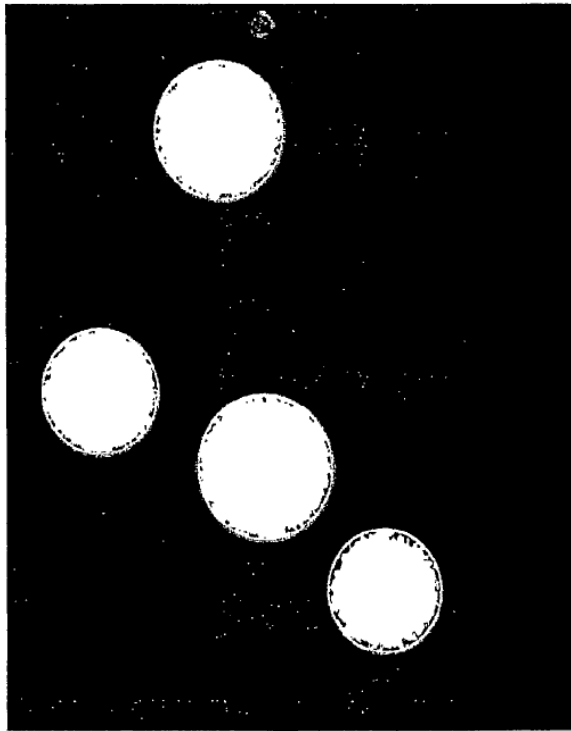


Fig. 5

45mM MgSO₄



30mM MgSO₄

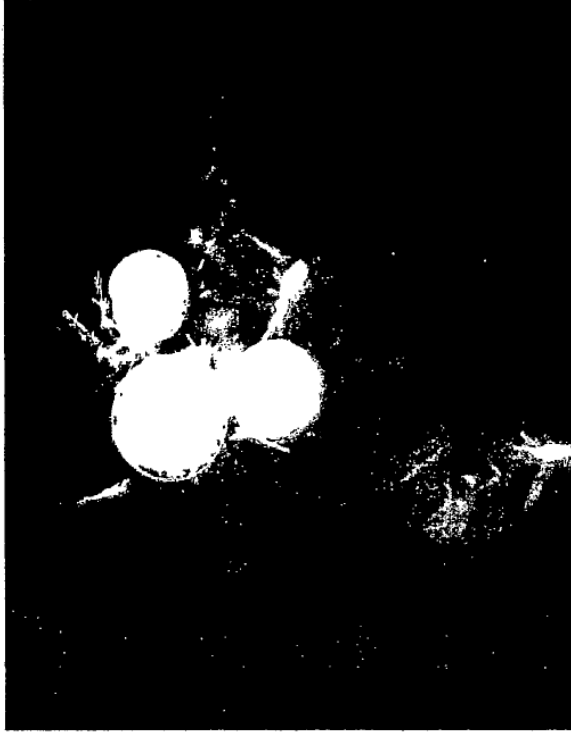


Fig. 6

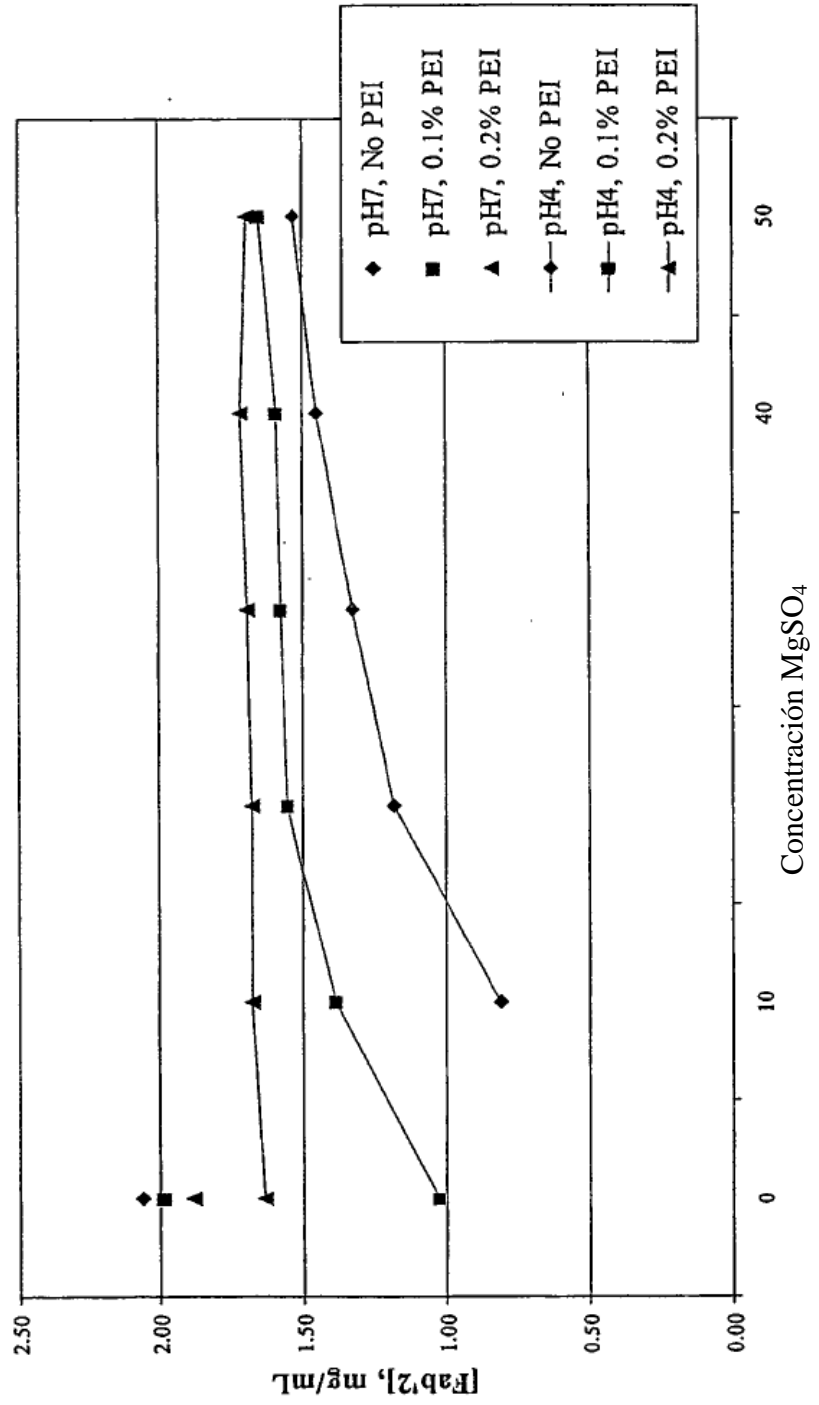


Fig. 7

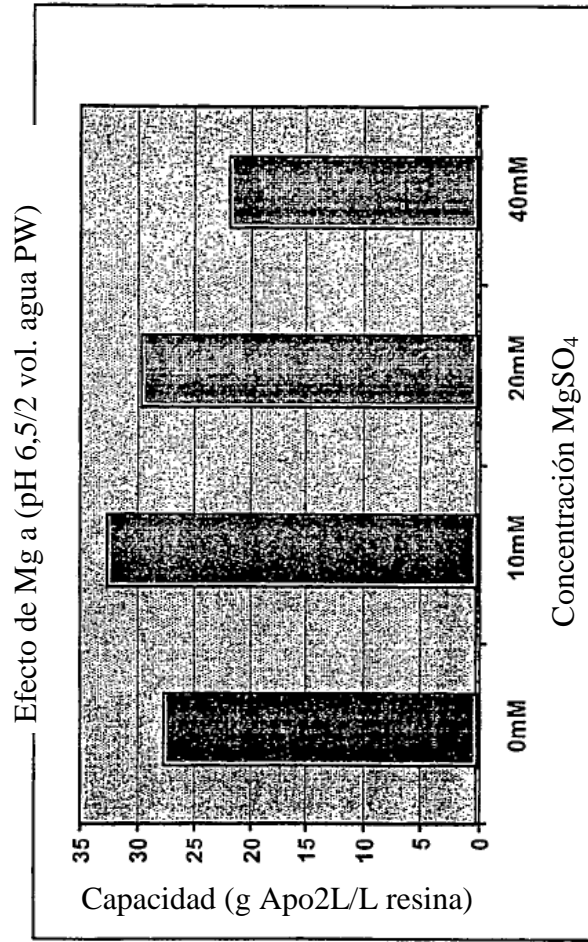


Fig. 8

