

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 697**

51 Int. Cl.:

B01D 15/36	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)
C07K 1/22	(2006.01)
C07K 16/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023682**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159441**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14714890 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2969099**

54 Título: **Eliminación de ligando de purificación por afinidad filtrado**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361785038 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2018

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320, US**

72 Inventor/es:

**TREJO, SAMUEL RAY y
BRAKE, ROBERT PERRY**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 674 697 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

Eliminación de ligando de purificación por afinidad filtrado

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de serie No.61/785,038, presentada el 14 de marzo de 2013.

Campo de la invención

La invención está en el campo de la eliminación de contaminantes a partir de preparaciones de proteínas. En un aspecto, la invención se refiere a la eliminación de contaminantes de cromatografía de afinidad lixiviados a partir de una preparación de proteína.

10 Antecedentes de la invención

La cromatografía de afinidad es una herramienta poderosa para la purificación de proteínas tales como anticuerpos y proteínas de fusión Fc. Sin embargo, si las proteínas se fabrican para uso terapéutico, la presencia de otras proteínas, incluida una proteína utilizada como parte de un adsorbente de afinidad, que puede filtrarse en una muestra durante la cromatografía de afinidad, es motivo de preocupación. Además, otros contaminantes proteicos también pueden estar presentes en una muestra, como, por ejemplo, proteínas derivadas de células huésped que producen la proteína que se purifica.

Las proteínas A y G se emplean a menudo para purificar anticuerpos mediante cromatografía de afinidad. Ford et al. (2001), J. Chromatogr. B 754: 427-435. Estas proteínas son útiles porque se unen a una porción constante (F_C) de muchos anticuerpos diferentes. Las proteínas de fusión recombinantes que incluyen una porción F_C de un anticuerpo IgG pueden purificarse usando métodos similares. En la mayoría de las operaciones de cromatografía de afinidad de proteína A y proteína G, pequeñas cantidades del ligando de proteína A o G se filtran desde la columna de afinidad y terminan en el eluido como ligando libre o ligando en complejo con la proteína diana. Si el anticuerpo o proteína de fusión se usa como un agente terapéutico, el ligando lixiviado y los complejos de ligando/proteína se deben eliminar.

Los fabricantes de resinas de cromatografía recomiendan usar la cromatografía de intercambio iónico para eliminar contaminantes residuales tales como la proteína A. Véase, por ejemplo, "Process Scale Antibody Purification" Application Note 11-0011-64 AA, 2004-11 (GE Healthcare). Kelley et al. informaron que la cromatografía de intercambio catiónico se usa más típicamente en un modo de unión y elución, en donde las impurezas menos básicas que el producto se eliminan en la carga y el lavado, y se separan más impurezas básicas del producto durante la elución. Kelley et al., 2008, Biotechnol. and Bioeng., vol. 100: 950-963. De acuerdo con los mismos autores, la cromatografía de intercambio aniónico se opera normalmente en un modo de flujo continuo, ya que polianiones tales como endotoxinas y ácidos nucleicos se pueden unir a la columna en condiciones que permiten que fluya el producto deseado. Id. en 950. La cromatografía de intercambio aniónico en un modo de flujo continuo también puede usarse típicamente para eliminar las proteínas de la célula huésped y la proteína A. Id. en 961.

La cromatografía con hidroxapatita es sorprendentemente eficaz para eliminar la proteína A lixiviada durante la producción de proteína a escala de proceso. La Patente de los Estados Unidos No. 7,476,722 describe que una columna de hidroxapatita puede funcionar en modo de flujo continuo mientras se mantiene más del 90% de recuperación de la proteína diana y la reducción en la proteína A contaminante de 5.3 a 5.4 veces. Sin embargo, en algunas situaciones, la hidroxapatita puede no ser conveniente de usar debido a inestabilidad mecánica y/o baja reutilización, o puede no eliminar suficientemente toda la proteína A lixiviada. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de formas alternativas de eliminación de la proteína A lixiviada, a la vez que al mismo tiempo se maximice la recuperación de proteína y por lo tanto se controlen los costes de producción de proteína recombinante.

La mayoría de los procesos de purificación de la plataforma de anticuerpos monoclonales consiste en una etapa de captura de afinidad seguida de una o dos etapas de pulimiento. Iskra et al. informaron de un cribado de alto rendimiento (HTS) para la caracterización de una etapa de pulimiento de cromatografía de intercambio aniónico de partición débil (Iskra et al., 2013, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 110(4): 1142-1152). Las propiedades de incrustación de Fractogel EMD TMAE HiCap (M), una resina de intercambio aniónico tentacular que se puede usar para tal etapa de pulimiento, fueron analizadas por Corbett et al. para determinar la influencia de la contaminación relacionada con el proceso. (Corbett et al., 2013, J. Chromat. A, Vol. 1278: 116-125).

Resumen de la invención

50 Aunque la cromatografía de afinidad es una técnica altamente efectiva para aislar proteínas, un inconveniente es que el ligando de afinidad puede contaminar la muestra resultante de proteína recombinante por lixiviación del medio de cromatografía de afinidad. Debido a que los ligandos de afinidad se eligen por su capacidad para asociarse con la proteína recombinante, puede ser un desafío eliminarlos de una preparación final sin perder también la proteína recombinante. La invención proporciona una forma efectiva, suave y fácilmente escalable de lograr este objetivo usando un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular. Aunque no hay intención de limitarse a ningún mecanismo particular, se cree que el aspecto de tentáculo del medio de cromatografía de matriz de

intercambio aniónico da a los métodos de la invención resultados inesperadamente mejores que los observados con cualquier otro tipo de resina de intercambio aniónico, o de hecho con la mayoría de las resinas, en la eliminación del ligando de afinidad sin pérdidas significativas en la recuperación de la proteína recombinante.

5 De acuerdo con lo anterior, el método proporciona, en un aspecto, un método para purificar una proteína de fusión del receptor del factor de necrosis tumoral recombinante Fc (TNFR-Fc) de una muestra que contiene la proteína recombinante y una segunda proteína que se une a la proteína, que comprende someter la muestra a un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico en condiciones en donde la proteína recombinante se une al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, seguido por elución de la proteína recombinante unida al medio de cromatografía en un eluyente, por lo que al menos 85% de la proteína recombinante se recupera en el eluyente y al menos el 75% de la segunda proteína se elimina del eluyente, en donde la segunda proteína es Proteína A o Proteína G y el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular contiene trimetilamonioetilo (TMAE). El sustrato de resina del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular puede ser una resina polimérica de metacrilato o una resina polimérica de polivinil estireno. En un aspecto de las realizaciones anteriores, el medio de cromatografía es Fractogel® EMD TMAE HiCap.

15 En todas las realizaciones anteriores, los métodos de la invención pueden usarse para purificar proteína recombinante que contiene una región C_{H2}/C_{H3} de un anticuerpo. Dichas proteínas se pueden purificar en columnas de afinidad tales como una resina de cromatografía de Proteína A o Proteína G. Por consiguiente, los métodos de la invención se pueden usar cuando la segunda proteína es la Proteína A o la Proteína G. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la muestra se puede obtener a partir de la purificación por afinidad de la proteína. Dicha purificación por afinidad puede ser sobre un medio de cromatografía de Proteína A.

En cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, la proteína recombinante es una proteína de fusión del receptor del factor de necrosis tumoral Fc, tal como, por ejemplo, etanercept.

Opcionalmente, en cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, después de que la proteína recombinante se una al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular y antes de que se eluya la proteína recombinante, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular puede someterse a un paso de lavado. Como otra opción en cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, la proteína recombinante puede someterse a purificación adicional antes y/o después de la cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular. Tales etapas adicionales de purificación incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía con hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel (exclusión por tamaño), cromatografía en modo mixto y/o filtración. Además, en todos los aspectos anteriores de la invención, la proteína recombinante también puede formularse posteriormente en una composición farmacéutica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados compilados de los experimentos de selección y optimización para cada una de las resinas indicadas según los ejemplos de trabajo 1 a 8. La recuperación de la proteína recombinante de prueba, etanercept, se representa gráficamente en el eje Y en función del porcentaje de reducción de proteína lixiviada, que se traza en el eje X. Las resinas utilizadas están indicadas y fueron las siguientes: DEAE Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences); Eshmuno® Q (EMD Millipore); Fractogel® SO3 (Merck Millipore); HIC (Toyopearl 650-M; ToyoScreen Ether-650M; ToyoScreen Phenyl-650M; ToyoScreen PPG-600M, todo de Tosoh Bioscience GmbH); resina en partículas CHT Ceramic Hydroxyapatite Type II 80 µm (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA); Q Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences); and Fractogel® EMD TMAE HiCap (EMD Millipore).

La Figura 2 es una superposición de las curvas de Recuperación/Reducción de Proteína A lixiviada representadas en la Figura 1. Los símbolos utilizados en el gráfico para cada resina se indican en la leyenda de la figura.

Descripción detallada

Definiciones

45 **Adsorbente:** Un adsorbente es al menos una molécula fijada a un soporte sólido o al menos una molécula que es, en sí misma, un sólido, que se usa para realizar la cromatografía.

Cromatografía de afinidad: La cromatografía de afinidad es una cromatografía que utiliza las interacciones reversibles específicas entre biomoléculas, por ejemplo, la capacidad de la proteína A para unirse a una porción de Fc de un anticuerpo IgG, en lugar de las propiedades generales de una molécula, tales como punto isoeléctrico, hidrofobicidad o tamaño, para efectuar la separación cromatográfica. En la práctica, la cromatografía de afinidad implica el uso de un adsorbente, como la proteína A fijada a un soporte sólido, para separar cromatográficamente las moléculas que se unen más o menos fuertemente al adsorbente. Véase Ostrove (1990) en Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology 182: 357-379.

55 **Cromatografía:** La cromatografía es la separación de moléculas químicamente diferentes en una mezcla una de la otra por percolación de la mezcla a través de un adsorbente, que adsorbe o retiene moléculas diferentes más o menos fuertemente. Las moléculas que se adsorben o retienen menos fuertemente por el adsorbente se liberan del adsorbente en condiciones en las que las más adsorbidas o retenidas no lo son.

Contaminante: Un contaminante es cualquier molécula extraña u objetable, particularmente una macromolécula biológica tal como un ADN, un ARN o una proteína, aparte de la proteína que se purifica, que está presente en una muestra de una proteína que se está purificando. Los contaminantes incluyen, por ejemplo, otras proteínas de células que secretan la proteína que se purifica y proteínas, como la proteína A, que son parte de un adsorbente utilizado para la cromatografía de afinidad que puede lixiviarse en una muestra durante la cromatografía de afinidad.

Purificar: Purificar una proteína significa reducir las cantidades de elementos extraños u objetables, especialmente macromoléculas biológicas tales como proteínas o ADN que pueden estar presentes en una muestra de la proteína. La presencia de proteínas extrañas se puede ensayar mediante cualquier método apropiado que incluya electroforesis en gel y tinción y/o ensayo ELISA. La presencia de ADN puede analizarse mediante cualquier método apropiado que incluya electroforesis en gel y tinción y/o ensayos que empleen la reacción en cadena de la polimerasa.

Separado: Una proteína se separa de una segunda proteína en una mezcla que comprende ambas proteínas cuando la mezcla se somete a un proceso tal que al menos la mayoría de las moléculas de la proteína se eliminan de la porción de la mezcla que comprende al menos la mayoría de las moléculas de la segunda proteína.

Sustancialmente similar: Para los fines de la invención, las proteínas son sustancialmente similares si tienen al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90% de identidad entre sí en la secuencia de aminoácidos y mantienen o alteran de manera deseable la actividad biológica de la proteína inalterada. Se incluyen en aminoácidos considerados idénticos para el propósito de determinar si las proteínas son sustancialmente similares, aminoácidos que son sustituciones conservadoras, siendo poco probable que afecten la actividad biológica, incluidos los siguientes: Ala para Ser, Val para Ile, Asp para Glu, Thr para Ser, Ala para Gly, Ala para Thr, Ser para Asn, Ala para Val, Ser para Gly, Tyr para Phe, Ala para Pro, Lys para Arg, Asp para Asn, Leu para Ile, Leu para Val, Ala para Glu, Asp para Gly, y estos cambios a la inversa. Véase por ejemplo Neurath et al, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York (1979). El porcentaje de identidad de dos secuencias amino se puede determinar mediante inspección visual y cálculo matemático, o más preferiblemente, la comparación se realiza comparando información de secuencia usando un programa informático tal como el paquete Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI) Programa de la versión 10.0 del paquete Wisconsin, 'GAP' (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 387) u otros programas informáticos comparables. Los parámetros por defecto preferidos para el programa 'GAP' incluyen: (1) la matriz de comparación de aminoácidos ponderada de Gribskov and Burgess ((1986), *Nucl. Acids Res.* 14: 6745), como se describe por Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979), u otras matrices de comparación comparables; (2) una penalización de 30 para cada brecha y una penalización adicional de 1 para cada símbolo en cada brecha para secuencias de aminoácidos; (3) no hay penalización por los huecos finales; y (4) sin penalización máxima por brechas largas. También pueden usarse otros programas usados por los expertos en la técnica de comparación de secuencias.

Descripción de los métodos de la invención

La invención proporciona un método para purificar una proteína de fusión del receptor Fc del factor de necrosis tumoral recombinante (TNFR-Fc) a partir de una muestra que contiene una segunda proteína que se une a la proteína, en donde la segunda proteína es Proteína A o Proteína G. El método implica someter la muestra a un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico en condiciones en donde la proteína recombinante se une al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, seguido por elución de la proteína recombinante unida al medio de cromatografía en un eluyente, en donde el medio de intercambio aniónico tentacular contiene trimetilamonioetilo (TMAE). Usando los métodos de la invención, los presentes inventores pudieron recuperar al menos el 85% de la proteína recombinante en el eluyente mientras que eliminaban al menos el 75% de la segunda proteína contaminante. De hecho, los métodos de la invención fueron tales que, en muchas condiciones, se puede recuperar al menos el 90% de la proteína recombinante en el eluyente mientras que al mismo tiempo se elimina al menos el 80% de la segunda proteína contaminante. Dichos resultados superiores no fueron posibles con ninguna otra cromatografía de interacción aniónica, catiónica o hidrófoba típicamente utilizada en la producción industrial. Aunque no hay intención de limitarse a ningún mecanismo particular, se cree que el aspecto de tentáculo del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico da a los métodos de la invención resultados inesperadamente mejores que los observados con cualquier otro tipo de resina de intercambio aniónico, o de hecho la mayoría de las resinas.

El término "medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular" se refiere a una tecnología tentacular de implementación de matriz de intercambio aniónico típicamente como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,398,962, 6,149,994, 5,866,673 o 5,647,987. Las matrices de intercambio aniónico que implementan la tecnología tentacular son partículas de resina que comprenden, usualmente en su superficie, espaciadores formados por cadenas poliméricas lineales (tentáculos), en donde los grupos funcionales que tienen actividad de intercambio aniónico están unidos a los tentáculos. En una realización adicional, las cadenas de polímero que forman dichos tentáculos son polímeros de acrilamida. En una realización particular, el grupo funcional de intercambiador de aniones fuerte es TMAE.

En un aspecto, el sustrato de resina del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular es una resina polimérica de metacrilato o una resina polimérica de polivinilestireno. En una realización, el polímero de metacrilato o polivinilestireno está reticulado. En los ejemplos descritos en este documento, las partículas de resina consisten en polímero de metacrilato reticulado. Ejemplos de matrices de intercambio aniónico tentacular son

Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE HiCap, Fractogel® EMD TMAE MedCap(m) e intercambiadores iónicos Fractoprep® DEAE (EMD Millipore).

En un aspecto, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular comprende (i) partículas de resina de polímero de metacrilato o de polímero de vinilo, tal como polímero de metacrilato, que puede ser polímero de metacrilato reticulado, (ii) tentáculos de acrilamida, en donde los tentáculos de acrilamida están unidos a la superficie de dichas partículas de resina, y en donde los grupos TMAE (trimetilaminoetilo) están unidos a los tentáculos de acrilamida funcionales.

Los métodos de la invención son particularmente útiles cuando la segunda proteína es una proteína lixiviada de un medio de cromatografía de afinidad sobre el que la proteína recombinante se ha purificado previamente de manera inicial. Por lo tanto, en una realización, la muestra que contiene la proteína recombinante y la segunda proteína se obtiene como resultado de una etapa de cromatografía de afinidad previa. Las proteínas de cromatografía de afinidad más comunes actualmente en uso son Proteína A, Proteína G y Proteína LG, que se usan para unir anticuerpos u otras proteínas que contienen una región C_{H2}/C_{H3} de un anticuerpo tal como proteínas de fusión Fc.

La proteína A es una proteína originalmente descubierta en la pared celular de *Staphylococcus* que se une específicamente a una porción F_C de un anticuerpo IgG. Para los fines de la invención, "Proteína A" es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína A Estafilocócica, que incluye formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de Proteína A. Para los fines de la invención, la actividad biológica de la Proteína A con el propósito de determinar la similitud sustancial es la capacidad de unirse a una porción de F_C de anticuerpo IgG.

La proteína G es una proteína originalmente descubierta en la pared celular de *Streptococcus* que se une específicamente a una porción Fc de un anticuerpo IgG. Para los fines de la invención, "Proteína G" es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína G Estreptocócica, que incluye las formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de la Proteína G. Para los fines de la invención, la actividad biológica de la Proteína G con el propósito de determinar la similitud sustancial es la capacidad de unirse a una porción Fc de un anticuerpo IgG.

Proteína LG es una proteína de fusión recombinante que se une a anticuerpos IgG que comprenden porciones de Proteína G (véase la definición anterior) y Proteína L. La proteína L se aisló originalmente de la pared celular de *Peptostreptococcus*. La proteína LG comprende dominios de unión a IgG tanto de Proteína L como de G. Vola et al. (1994) Cell. Biophys. 24-25: 27-36. Para los fines de la invención, "Proteína LG" es cualquier proteína idéntica o sustancialmente similar a la Proteína LG, que incluye formas comercialmente disponibles y/o recombinantes de Proteína LG. Para los fines de la invención, la actividad biológica de la Proteína LG con el fin de determinar la similitud sustancial es la capacidad de unirse a un anticuerpo IgG.

Hay muchos medios de cromatografía de proteína A comercialmente disponibles que pueden usarse para la purificación por afinidad, que incluyen resinas de vidrio de poro controlado ProSep® producidas por Millipore, y productos de resina de agarosa reticulada MabSelect™ producidos por GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences. Ambas resinas MabSelect y ProSep tienen capacidades de unión dinámica que se aproximan a más de 20 g/L, velocidades de flujo lineal para producir cantidades comerciales de anticuerpos que varían de 200 a 600 cm/hr estabildades de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. Ambos tipos de resina son químicamente estables cuando se exponen a urea y otros agentes reductores. Un tipo de medio de cromatografía de proteína A que se usa en los ejemplos que ilustran la presente invención es la resina de proteína A MabSelect SuRe™. La resina MabSelect SuRe™ Proteína A utiliza una forma recombinante alterada de proteína A que ha sido diseñada genéticamente para ser más estable que la proteína A nativa. Las cantidades lixiviadas de proteína A derivadas de una columna de proteína A MabSelect SuRe™ también pueden eliminarse usando los métodos de la invención. Todavía otro medio de cromatografía de Proteína A disponible comercialmente es resina Proteína A Sefarosa FF (GE Healthcare Life Sciences). Un ejemplo de un medio de cromatografía de proteína G disponible comercialmente es Proteína G Sefarosa 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). Los métodos de la invención implican utilizar resinas de afinidad conocidas y otras aún por desarrollar.

El proceso de la invención puede, en algunas realizaciones, implicar también al menos dos pasos. En primer lugar, la proteína recombinante se somete a una etapa de prepurificación de cromatografía de afinidad usando la segunda proteína fijada a un soporte sólido como adsorbente. En segundo lugar, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular se realiza en condiciones tales que la proteína recombinante se une al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular. Después de una etapa de lavado opcional, la proteína recombinante se eluye del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular. Todo el proceso de purificación de la proteína puede incluir otros pasos antes y/o después de cada uno de estos pasos, como se indica a continuación.

Antes del equilibrio y la cromatografía, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular puede preequilibrarse en una solución elegida, por ejemplo una solución de sal y/o regulador. El preequilibrio cumple la función de desplazar una solución utilizada para regenerar y/o almacenar el medio de cromatografía. Un experto en la materia advertirá que la composición de la solución de preequilibrio depende de la composición de la solución de almacenamiento y la solución que se utilizará para la cromatografía posterior. De este modo, las soluciones de preequilibrio apropiadas pueden incluir el mismo regulador o sal usado para realizar la cromatografía, opcionalmente,

a una concentración mayor que la utilizada para realizar la cromatografía. A continuación se tratan los reguladores y sales que pueden usarse para la cromatografía.

5 Antes de que la muestra sea aplicada a la columna, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular se puede equilibrar en el regulador o sal que se usará para someter a cromatografía la proteína. Como se analiza a continuación, la cromatografía (y la carga de la proteína por purificar) puede desarrollarse en una variedad de reguladores o sales que incluyen sales de sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato y/o citrato y/o reguladores Tris, fosfato, citrato, HEPES, MOPS y MES. Dichos reguladores o sales pueden tener un pH de al menos aproximadamente 5.5. En algunas realizaciones, el equilibrio puede tener lugar en una solución que comprende Tris o un regulador de fosfato de sodio. Opcionalmente, el regulador Tris o fosfato de sodio está a una concentración entre aproximadamente 0.5 milimolar y aproximadamente 50 milimolar, más preferiblemente a una concentración entre aproximadamente 15 milimolar y 35 milimolar. Preferiblemente, el equilibrio tiene lugar a un pH de al menos aproximadamente 5.5. El equilibrio puede tener lugar a valores de pH entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.6, preferiblemente a valores de pH entre aproximadamente 7.0 y 8.5. En un aspecto, la solución comprende un regulador Tris a una concentración de aproximadamente 25 milimolar y a un pH de aproximadamente 8.

15 Cualquiera o todas las etapas cromatográficas de la invención se pueden llevar a cabo por cualquier medio mecánico. La cromatografía se puede llevar a cabo en una columna. La columna puede ejecutarse con o sin presión y de arriba a abajo o de abajo hacia arriba. La dirección del flujo de fluido en la columna puede invertirse durante el proceso de cromatografía. La cromatografía también se puede llevar a cabo usando un proceso discontinuo en donde el soporte sólido se separa del líquido utilizado para cargar, lavar y eluir la muestra por cualquier medio adecuado, incluida la gravedad, la centrifugación o la filtración. La cromatografía también se puede llevar a cabo al poner en contacto la muestra con un filtro que adsorbe o retiene algunas moléculas en la muestra con más fuerza que otras.

20 Las condiciones para unir la proteína recombinante al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular pueden ser determinadas por un experto en la técnica y dependen de la carga de la proteína recombinante y la fuerza del grupo funcional aniónico. Opcionalmente, después de que la proteína recombinante se una al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular y antes de que se eluya la proteína recombinante, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular puede someterse a una etapa de lavado. El regulador de lavado es típicamente el mismo sistema regulador en donde la muestra se ha preparado y sometido al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, aunque un experto en la técnica podrá determinar otras condiciones de regulador para lavar la resina de cromatografía sin eluir de la proteína recombinante. Si se incluye un paso de lavado, el volumen del lavado puede ser pequeño o puede ser de varios volúmenes de columna. Sin embargo, típicamente, la columna se lava con de 0.5 a 10 volúmenes de columna, más típicamente de 1 a 5 volúmenes de columna. Después de la unión de la proteína recombinante al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, y opcionalmente el lavado del medio, la proteína recombinante se eluye aumentando la conductividad y/o reduciendo el pH del regulador utilizado para someter a cromatografía la muestra. La condición de regulador que puede eluir selectivamente la proteína recombinante dependerá, en parte, de la carga de la proteína recombinante y la fuerza del grupo aniónico.

25 En una realización, la proteína recombinante es la proteína de fusión recombinante etanercept (No de registro CAS 185243-69-0). Etanercept es una fusión recombinante del dominio extracelular soluble del receptor TNF p75 con el dominio Fc de una IgG1 humana que se produce en células de ovario de hámster chino (CHO), y está disponible comercialmente en Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) bajo el nombre comercial Enbrel[®]. La invención se ilustra a continuación por medio de ejemplos de trabajo usando etanercept como la proteína recombinante. En una realización de la invención, una muestra que contiene etanercept que se purificó por afinidad usando cromatografía de afinidad de proteína A, se somete a un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular en un regulador a aproximadamente pH 8. Tal regulador puede ser cualquier especie que regule bien en este intervalo de pH tal como un compuesto de fosfato o un Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) que ha sido valorada para tener aproximadamente pH 8. Un regulador Tris adecuado es de Tris:HCl 20 a 30 mM, más preferiblemente aproximadamente Tris:HCl 25 mM. Opcionalmente, antes de que el etanercept se eluya del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, el medio puede lavarse con el mismo regulador o un regulador ligeramente diferente, siempre que el etanercept permanezca unido al medio. En un aspecto, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular se lava con uno de los reguladores Tris adecuados anteriores. En un aspecto, la solución regulada para lavar la columna consiste esencialmente en Tris 25 mM a aproximadamente pH 8. La columna se puede lavar con volúmenes de 0.5 a 5 volúmenes de columna, más típicamente con de 1 a 3 volúmenes de columna.

30 Después de la unión de etanercept al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, y opcionalmente el lavado, se eluye. Se puede usar cualquier condición que eluya selectivamente la proteína recombinante etanercept. En un aspecto, el etanercept se eluye en un regulador de elución a un pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5, más preferiblemente de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.6. Una vez más, se puede utilizar cualquier especie reguladora que regule bien en este intervalo de pH, incluyendo pero no limitándose a Tris y compuestos de fosfato, así como ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES), y reguladores de citrato. Por ejemplo, el regulador de elución puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de Tris HCL, y de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8. En un aspecto, el regulador de elución es

aproximadamente 25 mM de Tris HCl, pH 7.2 a pH 7.6. Una realización de un regulador de elución es Tris HCl 25 mM, pH 7.2. Además, el regulador de elución puede tener una sal, tal como NaCl y/o sulfato de sodio. La concentración de sal puede variar de 0 mM a 500 mM, o de 100 a 200 mM. Por consiguiente, otro regulador de elución alternativo es Tris HCl 25 mM, pH 7.5 y NaCl de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 200 mM.

- 5 Usando los métodos de la invención, los presentes inventores han podido recuperar rendimientos muy altos de la proteína recombinante deseada a la vez que eliminan la mayor parte de la segunda proteína contaminante. Por lo tanto, en un aspecto, los métodos de la invención dan como resultado al menos 80%, más preferiblemente 85%, incluso más preferiblemente 90%, y lo más preferiblemente 95% de recuperación de la proteína recombinante en el eluyente. Al mismo tiempo, al menos el 70%, más preferiblemente el 75%, aún más preferiblemente el 80%, incluso más preferiblemente el 85% de la segunda proteína contaminante se elimina del eluyente, o se puede lograr cualquier combinación de las recuperaciones y eliminaciones anteriores.

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

15 "Purificar" una proteína recombinante, significa reducir el nivel de un contaminante no deseado. En los métodos de la invención, el contaminante no deseado es la segunda proteína. La segunda proteína, un complejo de la proteína recombinante y la segunda proteína, y/u otras proteínas que pueden estar presentes en una muestra de la proteína recombinante que se purifica, se pueden controlar por cualquier medio apropiado. Preferiblemente, la técnica debe ser lo suficientemente sensible para detectar contaminantes en el intervalo entre aproximadamente 0.5 partes por millón (ppm) (calculado como nanogramos por miligramo de la proteína que se purifica) y 500 ppm. Por ejemplo, el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), un método bien conocido en la técnica, puede usarse para detectar la contaminación de la proteína recombinante por la segunda proteína. Véase por ejemplo Reen (1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), en Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32: 461-466.

20 La cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular puede reducir la contaminación por una segunda proteína al menos aproximadamente dos veces, preferiblemente al menos aproximadamente tres veces, más preferiblemente al menos aproximadamente cinco veces, aún más preferiblemente al menos aproximadamente diez veces, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente quince veces, lo más preferiblemente al menos cerca de veinte veces. Preferiblemente, la contaminación de la proteína recombinante por la segunda proteína después de la cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular no es más de aproximadamente 100 ppm, más preferiblemente no más de aproximadamente 80 ppm, más preferiblemente no más de aproximadamente 60 ppm, más preferiblemente no más de aproximadamente 40 ppm, más preferiblemente no más que aproximadamente 20 ppm, más preferiblemente no más que aproximadamente 10 ppm, más preferiblemente no más que aproximadamente 5 ppm, más preferiblemente no más que aproximadamente 1 ppm, y lo más preferiblemente no más que aproximadamente 0.5 ppm. La contaminación por dicha segunda proteína puede oscilar desde niveles indetectables hasta aproximadamente 5 ppm o desde aproximadamente 5 ppm hasta aproximadamente 400 ppm. Si una proteína recombinante se está purificando para uso farmacológico, un experto en la técnica advertirá que el nivel preferido de la segunda proteína puede depender de la dosis de la proteína que se administrará por paciente, con el objetivo de que el paciente no reciba más de una cierta cantidad de una proteína contaminante por dosis. Por lo tanto, si la dosis requerida de la proteína disminuye, el nivel de contaminación por una segunda proteína posiblemente puede aumentar.

25 La invención se puede usar para purificar proteínas recombinantes, que son proteínas que se han producido usando técnicas de ingeniería genética. Preferiblemente, las proteínas se producen a escala de producción, que típicamente está en cantidades de varios gramos a la vez. La proteína que se somete a purificación según lo contemplado por la invención puede comprender uno o más dominios constantes de anticuerpos de inmunoglobulina y puede comprender, aunque no necesariamente, un dominio o dominios variables únicos o múltiples de anticuerpos de inmunoglobulina. Puede ser una proteína de origen natural o una proteína de fusión recombinante. Puede comprender una porción Fc de un anticuerpo. También puede comprender una proteína que no es anticuerpo.

30 Ejemplos de proteínas recombinantes que pueden purificarse con los métodos descritos aquí incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a todas o parte de una de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando flt3 (WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre et al. (1997), Science 277 (5322): 55-60), ligando para el receptor activador de NF-kappa B (RANKL, WO 01/36637), ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, WO 97/01633), linfopoyetina derivada de estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, patente australiana No. 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (Patente de Estados Unidos No. 6,204,363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, crecimiento y factor de desarrollo de megacariotas, RANTES, proteína 2 de tipo fibrinógeno humano (FGL2; No. de acceso NCBI NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160: 257-62) hormona del crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a la insulina,

hormona paratiroidea, interferones que incluyen interferones α , interferón γ e interferones de consenso (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,695,623 y 4,897,471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de cerebro, proteínas tipo sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas, factores estimulantes de colonias, linfotóxina- β , factor inhibidor de la leucemia y oncostatina-M. Descripciones de proteínas que pueden purificarse según los métodos divulgados se pueden encontrar en, por ejemplo, Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, todos los volúmenes (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y The Cytokine Handbook, Vols. 1 y 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Además, los métodos descritos aquí serían útiles para purificar proteínas que comprenden la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista de dicho receptor o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y/o proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas de receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, denominado p55 y p75, patente de los Estados Unidos No. 5,395,760 y patente de los Estados Unidos No. 5,610,279), receptores de interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; Patente EP No. 0460846, Patente de los Estados Unidos No. 4,968,607, y Patente de los Estados Unidos No. 5,767,064), antagonistas del receptor IL-1 (Patente US No. 6,337,072), antagonistas o inhibidores IL-1 (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,981,713, 6,096,728, y 5,075,222) receptores IL-2, receptores IL-4 (Patente EP No. 0 367 566 y Patente de los Estados Unidos No. 5,856,296), receptores IL-15, receptores IL-17, receptores IL-18, receptores Fc, colonia de granulocitos-macrófagos receptor del factor estimulante, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores para la oncostatina-M y factor inhibidor de la leucemia, activador del receptor NF-kappa B (RANK, WO 01/36637 y patente estadounidense No. 6,271,349), osteoprotegerina (patente estadounidense No. 6,015,938), receptores para TRAIL (incluidos los receptores TRAIL 1, 2, 3 y 4) y receptores que comprenden dominios de muerte, como Fas o receptor inductor de apoptosis (AIR).

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden purificar. Ejemplos incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a uno de estos: un miembro de la familia del dominio desintegrina y metaloproteinasas incluyendo la enzima convertidora de TNF-alfa, diversas quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador de plasminógeno tisular, factor VIII, factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

Los métodos divulgados también pueden usarse para purificar proteínas de fusión recombinantes que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucina, una espiral en espiral, una porción Fc de una inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente similar, pueden producirse usando los métodos de la invención. Véase por ejemplo WO94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259: 1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262: 1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371: 80-83; Håkansson y otros (1999), Structure 7: 255-64. Específicamente, se incluyen, entre dichas proteínas de fusión recombinantes, proteínas en las que una porción de una proteína, que incluye cualquiera de las proteínas anteriores, se fusiona con una porción Fc de un anticuerpo. Ejemplos de tales proteínas son etanercept (un p75 TNFR: Fc) y belatacept (CTLA4: Fc).

Los métodos descritos también pueden usarse para purificar anticuerpos o porciones de los mismos. El término "anticuerpo" incluye en referencia a inmunoglobulinas tanto glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase o a una región de unión a antígeno de las mismas que compite con el anticuerpo intacto por unión específica, a menos que se especifique lo contrario, incluyendo humanas, humanizadas, quiméricas, multiespecíficas, monoclonales, policlonales y oligómeros o fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina. También se incluyen proteínas que tienen un fragmento o región de unión a antígeno tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena simple, fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir un enlace de antígeno específico a un polipéptido diana. El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, aquellos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo.

Ejemplos de anticuerpos que pueden purificarse incluyen, pero no se limitan a, aquellos que reconocen una o una combinación de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor IL-2, receptor IL-4, receptor IL-6, receptor IL-13, IL-18 subunidades receptoras, FGL2, PDGF- β y análogos de las mismas (véanse las patentes estadounidenses Nos. 5,272,064 y 5,149,792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, receptor de EGF (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,235,883) receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos B (BlyS, también conocido como BAFF, THANK, TALL-1 y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto genético que se expresa en asociación con cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína asociada a tumores TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos

asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o páncreas, epítomos asociados cáncer o proteínas expresadas en células de cáncer de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, integrina VLA-4, integrinas B2, los receptores TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), la molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), leucointegrina adhesina, glucoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa tisular), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina, Virus Sincicial Respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Ejemplos específicos de anticuerpos conocidos que pueden producirse incluyen, pero no están limitados a adalimumab, bevacizumab, infliximab, abciximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, gemtuzumab, ozogamicina, golimumab, ibritumomab tiuxetan, labetuzumab, mapatumumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pentumomab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, rovelizumab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, zalutumumab y zanolimumab.

La proteína puede ser producida por células huésped vivas que han sido genéticamente modificadas para producir la proteína. Los métodos de ingeniería genética de células para producir proteínas son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Ausubel et al., eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York). Dichos métodos incluyen la introducción de ácidos nucleicos que codifican y permiten la expresión de la proteína en células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células fúngicas o, preferiblemente, células animales que han crecido en cultivo. Células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que no escinda ADN extraño. Células huésped fúngicas que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y células de *Aspergillus*. Algunos ejemplos de líneas de células animales que se pueden usar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3 y WI38. Se pueden establecer nuevas líneas de células animales usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección viral y/o selección). Opcionalmente, la proteína puede ser secretada por las células huésped en el medio.

Después de que la proteína recombinante es producida por las células, se cosecha. Si la proteína es secretada por las células en el medio de cultivo, las células y los desechos se eliminan del medio de cultivo mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas tales como centrifugación, filtración y/o floculación. Si la proteína recombinante se recoge dentro de la pared celular o membrana celular, se usan otras técnicas conocidas para recolectar y, si es necesario, solubilizar la proteína recombinante para operaciones de purificación posteriores.

Típicamente, la cromatografía de afinidad puede usarse como la primera etapa de purificación. La proteína recombinante en solución se une a un medio de cromatografía de afinidad, el medio se lava y la proteína recombinante se eluye interrumpiendo la unión de la proteína recombinante al ligando de afinidad. Esta muestra eluida que contiene la proteína recombinante y el ligando de afinidad como contaminante o segunda proteína se somete luego a los métodos de la invención en un medio de cromatografía de intercambio aniónico tentacular como se describe con más detalle anteriormente.

Después de que la proteína recombinante se eluye del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, el eluyente que contiene la proteína recombinante puede someterse a una etapa de purificación adicional. Alternativamente o, además, la muestra que contiene la proteína recombinante puede someterse a una etapa de purificación adicional antes de someterse a la cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular en los métodos de la invención. Tales etapas de purificación adicionales pueden ser otra etapa de cromatografía de intercambio iónico (aniónica y/o catiónica), otra etapa de cromatografía de afinidad, una etapa de cromatografía de afinidad a metal, una etapa de cromatografía en hidroxipatita, una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba, una etapa de cromatografía de filtración en gel (exclusión por tamaño), y/o una resina de cromatografía en modo mixto. Ejemplos de resinas disponibles comercialmente para tales etapas de cromatografía incluyen, pero sin limitación, resina de partículas CHT Hidroxipatita Tipo II 80 μ m (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA), DEAE Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences), Eshmuno[®] Q (EMD Millipore), Fractogel[®] SO3 (Merck Millipore), Toyopearl 650-M, ToyoScreen Ether-650M, ToyoScreen Phenyl-650M, ToyoScreen PPG-600M (Tosoh Bioscience GmbH), SP Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences), IMAC Sefarosa 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) y Q Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). Además, la proteína recombinante puede purificarse adicionalmente mediante filtración. La filtración puede ser directa (como filtración en bloque o en torta) o puede ser filtración de flujo tangencial.

En un aspecto, la proteína recombinante, tal como etanercept, se somete a cromatografía de afinidad sobre un medio de cromatografía de proteína A. Después de eluir la proteína recombinante, la muestra que contiene la proteína recombinante puede purificarse sobre un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular usando los métodos de la invención como se describió anteriormente. Sin embargo, antes o después de someter la proteína recombinante al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, se puede realizar una etapa de

cromatografía adicional. Por ejemplo, la proteína recombinante puede someterse a cromatografía de hidroxapatita en modo de flujo continuo para mejorar la eliminación de proteína A y otros contaminantes, o cromatografía de intercambio aniónico o de cationes (flujo pasante o unión y elución) o cromatografía de interacción hidrófoba (flujo pasante o unión y elución).

- 5 Después de que la proteína recombinante se eluye de la cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, la proteína puede someterse a etapas de purificación adicionales como se indicó anteriormente, antes de ser formulada, o puede ser formulada directamente. El término "formulada" significa que la proteína se intercambia con regulador, se esteriliza, se envasa a granel y/o se envasa para un usuario final. En una realización, la proteína recombinante es formulada en una composición farmacéutica. Formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplos

- 15 Ejemplo 1: El objetivo de estos experimentos fue eliminar eficazmente la proteína A contaminante de una preparación de proteína recombinante a la vez que se recuperaba la mayor cantidad posible de proteína recombinante. Una proteína recombinante, etanercept, se expresó en un cultivo celular CHO (ovario de hámster chino) transformado, y se secretó en el medio. Después de la eliminación de las células del medio, el etanercept se purificó inicialmente haciendo pasar el medio sobre una columna de resina Protein A MabSelect SuRe™ (GE Healthcare Life Sciences). La proteína A lixiviada se determinó usando un ensayo de ELISA sándwich. Las placas de microtitulación se recubrieron con un anticuerpo anti- proteína A de pollo como anticuerpo de captura, que se generó específicamente contra el ligando MabSelect SuRe. Después de las etapas de bloqueo y lavado, se usó un anticuerpo anti-proteína A de pollo biotinilado como anticuerpo de detección. La cantidad de proteína A lixiviada en la muestra después de la purificación inicial sobre la columna de resina de Proteína A Sureb™ MabSelect varió desde aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 20 ppm.

- 25 En los siguientes experimentos, el etanercept inicialmente purificado se pasó sobre una resina de partículas CHT Hidroxapatita Cerámica tipo II 80 µm (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones. El rendimiento de etanercept, expresado como %, se determinó usando ELISA en la pre y post-recolección de muestra. La cantidad de reducción de proteína A lixiviada, también expresada como %, se determinó antes y después de la cromatografía con hidroxapatita usando el ELISA tipo sándwich descrito anteriormente.

Resina: Hidroxapatita								
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)	
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	3.02	6.69	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.8	2.9	96.8	20.3	
Fosfato de sodio 25 mM, pH 6.8	2.96	6.74	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	93	51.4	
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.98	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	96.4	11.5	
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.98	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	95.9	16.7	
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.98	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	96.8	17.9	

ES 2 674 697 T3

Resina: Hidroxiapatita							
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.98	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	93.6	17.9
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.98	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.83	2.9	95.9	11.5
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.81	6.76	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.72	2.9	94	19.4
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.81	6.76	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.72	2.9	92	29
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.81	6.76	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.72	2.9	95.2	9.68
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.81	6.76	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.72	2.9	92.7	30.6
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	2.81	6.76	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.72	2.9	95.3	19.4
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	3.16	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.82	2.9	96.1	40.7
Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	3.16	6.72	Fosfato de sodio 25 mM pH 6.8	6.82	2.9	97.3	39.5
Acetato de Sodio 100 mM, Cloruro de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3M, pH 6.8	15.58	6.87	Acetato de Sodio 100 mM, Cloruro de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3M, pH 6.8	6.84	13.6	92	77.6
Fosfato de sodio 5 mM	no registrado	6.9	Fosfato de sodio 5 mM	6.89	0.661	93.1	31.1
Fosfato de sodio 10 mM	5.54	6.94	Fosfato de sodio 10 mM	6.85	1.25	97.3	12.5

ES 2 674 697 T3

Resina: Hidroxiapatita							
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)
Fosfato de sodio 50 mM MES, 5 mM	5.92	6.75	Fosfato de sodio 50 mM MES, 5 mM	6.81	2.88	98.7	12.7
Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3 mM, Cloruro de Sodio 65 mM, pH 6.75, cond. 14.77	4.33	6.77	Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3 mM, Cloruro de Sodio 65 mM, pH 6.75, cond. 14.77	6.75	14.77	93.6	50
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	9.68	6.96	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 9 mM, pH 6.8	6.73	17.96	80.8	61.8
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	8.13	7	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	86.9	57
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	7.64	6.9	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 6 mM, pH 6.8	6.8	18.46	97.1	82.4
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	9.72	6.91	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 9 mM, pH 6.8	6.73	17.96	93.3	63.6
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	no registrado	no registrado	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 6 mM, pH 6.8	6.8	18.46	92.9	65.5

ES 2 674 697 T3

Resina: Hidroxiapatita							
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	14.16	6.84	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	88.3	30.3
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	8.07	6.94	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 6 mM, pH 6.8	6.8	18.46	98.8	61.8
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	14.2	6.88	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 6 mM, pH 6.8	6.8	18.46	90.5	23.6
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	13.7	6.83	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	79.3	58.2
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	7.57	6.9	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	91.5	84.8
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	9.88	6.89	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 9 mM, pH 6.8	6.73	17.96	88.4	63

ES 2 674 697 T3

Resina: Hidroxiapatita							
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	8.16	6.92	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	98.7	55.5
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	no registrado	no registrado	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	18.99	88.4	9.09
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 25 mM, pH 6.8	16.15	6.72	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 25 mM, pH 6.8	6.77	21.1	98.5	-1.5
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	15.63	6.76	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	21.8	97.9	13.2
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	no registrado	no registrado	8 Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	6.82	20	99	67.6
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 25 mM, pH 6.8	9.88	6.96	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 25 mM, pH 6.8	6.77	21.1	102	-1.5

Resina: Hidroxiapatita							
Regulador de equilibrio	Cond. carga(mS/cm)	pH carga	Regulador de lavado	pH Elución	Cond. Regulador elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción proteína lixiviada (%)
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	8.83	6.88	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 12 mM, pH 6.8	6.8	21.8	94.6	42.6
Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	8.24	6.86	Cloruro de Sodio 100 mM, Acetato de Sodio 100 mM, Fosfato de Sodio 3mM, pH 6.8	6.82	20	87.4	82.4

Utilizando la cromatografía de hidroxiapatita en modo de flujo continuo, fue posible eliminar más del 80% de la proteína A lixiviada mientras se recuperaba más del 90% de la proteína etanercept.

5 Ejemplo 2: Utilizando la resina de intercambio de aniones relativamente débil DEAE Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences), se exploró una variedad de diferentes reguladores y condiciones de elución como se detalla en la siguiente tabla. Las concentraciones de etanercept y proteína A se determinaron como en el Ejemplo 1.

Resina de prueba: DEAE Sefarosa FF							
Modo/Equilibrio y regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	Conductividad del regulador de elución (mS/cm)	Rata de flujo de elución	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	17.14	0.5 mL/min	80	27.9
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	17.14	0.5 mL/min	85	26.2
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	20	0.5 mL/min	85	15.1
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	20	0.5 mL/min	84	46.3
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7.5	13.7	0.5 mL/min	86	55.9

ES 2 674 697 T3

Resina de prueba: DEAE Sefarosa FF							
Modo/Equilibrio y regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	Conductividad del regulador de elución (mS/cm)	Rata de flujo de elución	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7.5	13.7	0.5 mL/min	85	61.3
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4	13.3	0.5 mL/min	72.4	96.3
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4	13.3	0.5 mL/min	74.7	93.2
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.94	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7.4	29.2	100 cm/hr	94.1	1.75
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.94	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4	13.6	100 cm/hr	77.4	94.6
Unir/eluir/Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.94	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4	13.6	100 cm/hr	79.8	94.5
Flujo pasante/Fosfato de sodio 55 mM	6.7	11.28	No aplicable	no registra	No aplicable	95	25
Unir/eluir/Tris 25 mM	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 100 mM	12.14	25 cm/hr	64.6	88.2
pH 7.4			NaCl pH 7.4				
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	16.7	25 cm/hr	87.1	9.8
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 200 mM pH 7.4	21.2	25 cm/hr	87.3	-2
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 100 mM pH 7.4	12.14	25 cm/hr	72.6	94.1

Resina de prueba: DEAE Sefarosa FF							
Modo/Equilibrio y regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	Conductividad del regulador de elución (mS/cm)	Rata de flujo de elución	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	16.7	25 cm/hr	89.5	23.5
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 200 mM pH 7.4	21.2	25 cm/hr	88.2	11.8
eluir/Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	17.98	25 cm/hr	87	11.3
Unir/eluir/Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	17.98	25 cm/hr	84.2	9.43

Como puede verse a partir de los datos anteriores, la DEAE Sefarosa puede eliminar un alto porcentaje de Proteína A lixiviada bajo ciertas condiciones. Sin embargo, en esas condiciones, la recuperación de la proteína recombinante etanercept se vio afectada.

- 5 Ejemplo 3: en este experimento, se ensayó una resina intercambiadora de aniones diferente por su capacidad de eliminar la proteína A mientras se mantenía una alta velocidad de recuperación. La resina era Eshmuno® Q, que está disponible en EMD Millipore, una división de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Todas las ejecuciones estaban en un modo de unión y elución.

Resina: Eshmuno Q						
Regulador de equilibrio y de lavado	Cond. carga(mS / cm)	pH carga	Regulador de elución y conductividad	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)	
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.4, cond. 21 mS/cm	93.8	55.6	
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.4, cond. 21 mS/cm	94.4	60.8	
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.4, cond. 21 mS/cm	92	64.7	
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.4, cond. 21 mS/cm	92.5	63.3	

- 10 Aunque la recuperación de etanercept fue alta usando esta resina, la reducción de Proteína A no fue suficiente.

Ejemplo 4: El intercambiador de cationes fuerte Fractogel® SO3 (Merck Millipore) también se probó en una gran variedad de condiciones detalladas en la siguiente tabla. Para todas las condiciones, el modo fue unir y eluir, el regulador de equilibrio y lavado fue acetato de sodio 75 mM, y la elución fue a 150 cm/hr en un regulador de acetato de sodio 100 mM a la concentración de sal indicada (expresada en mM).

ES 2 674 697 T3

Resina de prueba: Fractogel SO3						
pH carga	Cond. carga(mS/cm)	Elución pH	Elución NaCl(mM)	Cond. de regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
6	6	5	75	15.4	54.7	74
6	6	6	225	28.1	92.8	-26
5.25	5	5.5	150	21.5	112.2	3.16
4.5	6	5	75	15.4	77.5	70.7
6	4	6	75	15.24	95.8	40
6	6	5	75	15.4	61.1	79
4.5	4	5	75	15.4	69.7	65.8
6	4	5	75	15.4	76.4	35.8
6	4	6	225	28.1	107.7	-12
6	6	6	75	15.24	85.3	73
4.5	6	6	225	28.1	111.9	-17
6	4	5	75	15.4	69.8	52.6
4.5	4	6	75	15.24	105.1	32.9
4.5	4	6	225	28.1	107.4	-41
6	6	6	225	28.1	91.5	-38
5.25	5	5.5	150	21.5	109.2	8.42
4.5	4	5	225	28.9	107.3	-13
4.5	6	5	225	28.9	108.6	8.7
6	6	5	225	28.9	89.5	-6
4.5	4	5	75	15.4	66.3	69.6
4.5	6	5	75	15.4	73.1	76.1
6	4	5	225	28.9	112.4	-1.1
6	6	6	75	15.24	81.6	79

ES 2 674 697 T3

Resina de prueba: Fractogel SO3						
pH carga	Cond. carga(mS/cm)	Elución pH	Elución NaCl(mM)	Cond. de regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
5.25	5	5.5	150	21.5	109.4	26.3
4.5	6	6	75	15.24	97.9	44.6
4.5	6	5	225	28.9	105.6	7.61
4.5	6	6	225	28.1	103.9	3.26
4.5	4	6	75	15.24	100.9	34.2
6	4	6	225	28.1	106	-5.3
6	4	6	75	15.24	98	41.1
4.5	6	6	75	15.24	103.8	50
6	6	5	225	28.9	89.5	-16
4.5	4	5	225	28.9	108.5	1.27
4.5	4	6	225	28.1	110.1	-13
6	4	5	225	28.9	108.1	-5.3
5.25	5	5.5	150	21.5	108.1	7.37
4.97	4.43	5.7	85	16	96.1	49
4.97	4.43	5.7	85	16	99.6	44.4
5.01	4.51	5.7	85	17.98	101.4	27.5
5	4.49	5.7	85	15.82	94.23	50
5	4.49	5.7	85	15.82	91.82	27.2
5	4.48	5.7	85	15.82	91.56	53.8
4.51	5	5	106	17.41	72.54	45.4
5.01	4.51	5.7	85	17.98	97.4	48.8
5.01	4.51	5.7	85	17.98	97.6	47.5
5	4.4	5.7	85	17.45	96.2	14.5

ES 2 674 697 T3

Resina de prueba: Fractogel SO3						
pH carga	Cond. carga(mS/cm)	Elución pH	Elución NaCl(mM)	Cond. de regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
5.01	4.47	5.3	170	23.5	95.3	20.2
5.01	4.47	5.5	135	20.5	95.6	26.9
5.01	4.47	5.3	100	17.31	87	47.7
5.01	4.47	5.7	100	17.17	91.5	48
5.01	4.47	5.5	135	20.5	94.8	26.9
5.01	4.47	5.7	170	23.5	97	26.9
5.03	4.56	5.7	85	16.07	84.02	50.4
5.02	4.54	5.7	85	16.07	86.1	52
5.1	4.45	5.7	85	14.97	83.9	56.9
5.028	4.67	5.7	85	15.21	82.9	43.4
5.07	4.5	5.7	85	14.99	80.8	40.5
5.09	4.5	5.7	85	14.99	86.6	40.5

5 Algunos de los rendimientos se calcularon en más del 100% en este experimento. Sin embargo, esto refleja una diferencia en el procedimiento y el cálculo de la carga, a diferencia de una diferencia en la función de la etapa de cromatografía, y para fines de la ejecución se tomaron como un rendimiento del 100%. Aunque el rendimiento fue en general muy alto con esta resina, la eliminación de la proteína A lixiviada fue insuficiente en todas las condiciones ensayadas.

10 Ejemplo 5: En este experimento, se examinaron varias resinas de cromatografía de interacción hidrófoba diferentes para determinar su capacidad para eliminar la proteína A lixiviada mientras se mantenía un alto nivel de recuperación de la proteína recombinante. Las columnas se equilibraron y se lavaron con citrato de sodio, pH 3.8 (excepto para la última ejecución en HIC-ToyoScreen Phenyl-650 que se realizó a un pH de carga más alta y se lavó con citrato de sodio 75 mM, pH 5.5). Cada una de las columnas se cargó y ejecutó en un modo de flujo continuo a aproximadamente 1 ml/minuto, y se lavó con aproximadamente 3 volúmenes de columna.

Resina: HIC							
Subtipo de resina	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Elución pH	Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Toyopearl 650-M	11.75	3.8	3.8	Citrato de sodio 75 mM, pH 3.8	5.59	46.9	89

ES 2 674 697 T3

Resina: HIC								
Subtipo de resina	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Elución pH	Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína lixiviada (%)	A
ToyoScreen Éter-650M	11.41	3.82	3.8	Citrato de sodio 75 mM, pH 3.8	5.77	62.6	13	
ToyoScreen éter-650M	11.22	3.82	3.8	Citrato de sodio 75 mM, pH 3.8	5.78	105.2	9.57	
ToyoScreen Fenil-650M	11.48	3.81	3.9	Citrato de sodio 75 mM, pH 3.8	5.78	104.4	11	
ToyoScreen Fenil-650M	15.03	3.76	3.8	Citrato de sodio 150 mM, pH 3.8	10.19	104.3	6.73	
ToyoScreen Fenil-650M	20.7	3.71	3.7	Citrato de sodio 300 mM, pH 3.8	17.4	103.8	4.5	
ToyoScreen Fenil-650M	8.54	3.15	3.1	Citrato de sodio 75 mM, pH 3	3.3	85.7	-4.8	
ToyoScreen Fenil-650M	17.78	5.55	5.6	Citrato de sodio 75 mM, pH 5.5	12.76	105.3	-1.7	
ToyoScreen PPG-600M	11.5	3.81	3.9	Citrato de sodio 75 mM, pH 3.8	5.78	105.3	9.57	

Aunque fue posible recuperar altas cantidades de la proteína recombinante etanercept, se observó muy poca reducción de la Proteína A en estas condiciones.

5 Ejemplo 6: El intercambiador de aniones fuerte, Q Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) también se ensayó en una serie de condiciones como se ilustra en la siguiente tabla.

Resina: Q Sefarosa FF							
Regulador de equilibrio y lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución y pH de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína lixiviada (%)	A
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	25 mM Tris, NaCl 175 mM, pH 7.4	20	81	47.1	
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.4	20	80	33	

ES 2 674 697 T3

Resina: Q Sefarosa FF							
Regulador de equilibrio y lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución y pH de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína lixiviada (%)	de A
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.4	19.7	78	47.6	
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.4	19.7	77	40.4	
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	18.2	79	59.6	
Tris 25 mM, pH 8	5.2	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	18.2	74	59.1	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 106mM pH 7.4	12.85	44.5	100	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	17.11	75.1	77.4	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	18	78.5	56.6	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	17.11	75.5	50.9	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	18	80.2	77.4	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, NaCl 180 mM pH 7.4	20.3	90.7	34	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.4	Tris 25 mM, 190mM NaCl pH 7.4	21.8	89.8	22.6	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	18	81.3	64.7	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 200 mM pH 7.4	21.2	86.6	17.6	
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	16.29	80	67.9	
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4	16.29	80.4	67.9	
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	17.98	87.9	39.6	

ES 2 674 697 T3

Resina: Q Sefarosa FF							
Regulador de equilibrio y lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución y pH de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)	A
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	17.98	86.6	45.3	
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 175 mM pH 7.4	19.4	88	28.3	
Tris 25 mM pH 7.4	5	7.4	Tris 25 mM, NaCl 175 mM pH 7.4	19.4	88.3	26.4	
Tris 25 mM pH 7.4	4	7.6	Tris 25 mM, NaCl 165 mM pH 7.4	17.98	82.7	61.1	
Tris 25 mM pH 7	6	7	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7	18.67	85.9	29.8	
Fosfato de sodio 25 mM, pH 6.8	6	6.8	Fosfato de sodio 25 mM, NaCl 165 mM, pH 6.9	18.53	82.8	31.6	
Fosfato de sodio 25 mM, pH 6.6	6	6.6	Fosfato de sodio 25 mM, NaCl 165 mM, pH 6.6	18.21	82.2	28.6	

Con Q Sefarosa FF, tanto el rendimiento como la eliminación de la proteína A lixiviada no fueron suficientes bajo ninguna condición.

5 Ejemplo 7: Se evaluaron varias resinas adicionales en experimentos iniciales (no mostradas), pero se mostraron poco prometedoras en alcanzar el nivel deseado de purificación y recuperación. Por lo tanto, no fueron sometidas a los experimentos de optimización que se muestran aquí.

Ejemplo 8: En este experimento, se ensayó Fractogel® EMD TMAE HiCap (EMD Millipore) en una variedad de condiciones como se detalla en la siguiente tabla. Todas las ejecuciones siguientes se realizaron en modo de unión y elución y se lavaron con 10, 5 o 3 volúmenes de columna.

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.4	19.3	83.9	83.8
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.6	7.6	18.6	82.7	72.8

ES 2 674 697 T3

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.6	7.6	18.6	80.2	71.4
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	19.3	81.8	66.7
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	19.3	81.8	66.1
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	19.3	83.2	65.7
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	19.3	84.5	66.7
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.6	7.6	18.6	84.6	80.6
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 165 mM, pH 7.6	7.6	18.6	84	73.2
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.46	15.7	88.4	87.1
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.46	15.7	90.3	87.3
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8.1	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.41	16.68	72.7	83.7
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	4.9	8.1	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.41	16.68	72.6	78.6
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.9	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7.4	7.4	29.2	99.2	16.8

ES 2 674 697 T3

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.9	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7.4	7.4	29.2	99.7	6.54
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.9	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.5	16.72	86.5	89.4
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, pH 8	5.2	7.9	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.5	16.72	88.5	88.8
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8	8	28.5	101.3	8.62
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	6	7.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7	7	28.9	98.2	10.3
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	4	7.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8	8	13	43.8	100
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	98.2	79.3
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	95.8	78.4
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7	7	13.9	50.5	100
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	4	8.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7	7	13.9	100.2	6.25
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7	7	28.9	100	11.2

ES 2 674 697 T3

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	4	8.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8	8	13	46.2	100
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	98.1	82
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	4	7.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7	7	13.9	56.2	100
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	96.6	81.1
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	6	7.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8	8	13	32.9	100
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	4	7.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8	8	13	42.2	100
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7	7	13.9	43.9	81.9
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	97	74.8
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	96.6	82.9
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	4	8.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8	8	28.5	98.5	25
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	6	7.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8	8	28.5	95.2	25.9

ES 2 674 697 T3

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	4	7.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7	7	28.9	98.9	5.77
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 4 mS/cm	4	8.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7	7	13.9	55.6	100
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 6 mS/cm	6	7.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7	7	13.9	45	100
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7	7	28.9	100.3	24.1
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	97.5	84.7
Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8.5, cond. 6 mS/cm	6	8.5	Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8	8	13	34.3	100
Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	Tris 25 mM, pH 7.5, cond. 4 mS/cm	4	7.5	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8	8	28.5	98.6	11.5
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7.5	7.5	21.6	95.2	82
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	91.6	70.1
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	90.6	85.1

ES 2 674 697 T3

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	94	87.4
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	91.4	82.9
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	91.7	88
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	87.8	81.9
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	21.2	91.7	61.4
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	95.7	61.7
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	95.7	65
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	91.6	70
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	94.9	65.9
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	92.7	68.4

Resina: Fractogel® EMD TMAE HiCap								
Regulador de Equilibrio	Regulador de lavado	Cond. Carga (mS/cm)	pH carga	Regulador de elución	pH Regulador de elución	Cond. regulador de elución (mS/cm)	Rendimiento (%)	Reducción de proteína A lixiviada (%)
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	97.9	86.2
Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, pH 7.2, cond. 20 mS/cm	7.2	20	97.4	61.1
Tris 25 mM, NaCl 33 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 180 mM, pH 7.2	7.2	19.6	96	69.6
Tris 25 mM, NaCl 33 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, NaCl 180 mM, pH 7.2	7.2	19.6	96.3	72
Tris 25 mM, NaCl 33 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	Tris 25 mM, pH 8, cond. 5 mS/cm	5	8	Tris 25 mM, 160mM NaCl, pH 7.2	7.2	20	92.7	67.8
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, NaCl 45 mM, pH 8.0	4.61	7.91	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.4	no registrado	82.3	93.9
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, NaCl 45 mM, pH 8.0	4.58	7.87	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.4	no registrado	82.7	94.3
Tris 25 mM, pH 8	Tris 25 mM, NaCl 45 mM, pH 8.0	4.75	7.87	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4	7.4	no registrado	no registrado	92

En comparación con las otras resinas para cromatografía de aniones, cationes e interacciones hidrófobas analizadas, el Fractogel® EMD TMAE HiCap fue sorprendentemente bueno para eliminar la Proteína A a la vez permite una recuperación muy alta de la proteína diana. Los resultados de todas las resinas que se investigaron minuciosamente se representaron gráficamente en la Figura 1. En la Figura 2 se muestra una superposición de todas las resinas en una gráfica de dispersión global. La tendencia general para todas las resinas es disminuir el rendimiento al aumentar la eliminación de proteína A. Sin embargo, en la parte totalmente optimizada de los datos, hay un "hombro" que contiene solo resultados usando resinas Hidroxiapatita o Fractogel® EMD TMAE gHiCap.

Las realizaciones específicas descritas en este documento pretenden ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en este documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína de fusión recombinante del receptor del factor de necrosis tumoral Fc (TNFR-Fc), preferiblemente etanercept, a partir de una muestra que contiene la proteína recombinante y una segunda proteína que se une a la proteína, que comprende someter la muestra a un medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular en condiciones en las que la proteína recombinante se une al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular, seguido por elución de la proteína recombinante unida al medio de cromatografía en un eluyente, recuperando al menos el 85% de la proteína recombinante en el eluyente y al menos el 75% de la segunda proteína se elimina del eluyente; en donde
 - a) la segunda proteína es Proteína A o Proteína G; y
 - b) el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular contiene trimetilamonioetilo (TMAE).
2. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato de resina del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular es una resina polimérica de metacrilato o una resina polimérica de polivinilestireno, preferiblemente en la que el medio de cromatografía es Fractogel® EMD TMAE HiCap.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la muestra se obtiene por purificación por afinidad de la proteína sobre un medio de cromatografía de Proteína A.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra se somete al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular a aproximadamente pH 8.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde después de que la proteína recombinante se une al medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular y antes de que se eluya la proteína recombinante, el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular se somete a una etapa de lavado.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de lavado comprende lavar el medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular con una solución regulada a aproximadamente pH 8, preferiblemente en donde la solución regulada consiste esencialmente en Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 25 mM aproximadamente pH 8.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína recombinante se eluye del medio de cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular en un regulador de elución a un pH de 7.2 a 7.5.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el regulador de elución es Tris HCl 25 mM, pH 7.2; o en donde el regulador de elución es Tris HCl 25 mM, pH 7.5 y NaCl desde 150 mM hasta 200 mM.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la proteína recombinante se somete a una etapa de purificación adicional antes o después de la cromatografía de matriz de intercambio aniónico tentacular.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína recombinante se formula en una composición farmacéutica.

FIGURA 1 Rendimiento (%) vs. reducción de proteína A lixiviada (%) por resina



